

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Abteilung Medizinische Zellbiologie  
Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Morphologische und molekularbiologische Veränderungen der Skelettmuskulatur beim experimentellen Fibromyalgie- Mausmodell**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Hanna Then aus Schweinfurt  
Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 15.05.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. R. Kinscherf

Korreferent: Herr PD Dr. A. Skwara







# Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Abkürzungsverzeichnis.....  | VII |
| Abbildungsverzeichnis.....  | XII |
| Tabellenverzeichnis.....  | XIV |
| 1    Einleitung.....  | 1   |
| 1.1    Fibromyalgie-Syndrom: Definition und Epidemiologie .....           | 1   |
| 1.2    FMS: Diagnosestellung .....  | 1   |
| 1.3    FMS: Hypothesen zur Ätiologie.....                                 | 2   |
| 1.4    Angiogenese .....  | 5   |
| 1.4.1    Allgemeines .....  | 5   |
| 1.4.2    Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Familie .....             | 5   |
| 1.4.3    “Suppressor of Cytokine Signaling (Socs)”-Familie .....          | 8   |
| 1.4.4    Der Notch-Signaltransduktionsweg .....                           | 10  |
| 1.4.5    Zusammenhang der untersuchten Angiogenese-Faktoren.....          | 12  |
| 1.5    Atrophie.....  | 13  |
| 1.5.1    Allgemeines .....  | 13  |
| 1.5.2    Familie der Muskel-spezifischen RING-Finger-Proteine (MuRF)..... | 16  |
| 1.5.3    Fbxo32 .....   | 17  |
| 1.6    Apoptose .....   | 19  |
| 1.6.1    Allgemeines .....  | 19  |
| 1.6.2    Signalwege während der Apoptose .....                            | 19  |
| 1.6.2.1    Intrinsischer Signalweg.....                                   | 19  |
| 1.6.2.2    Extrinsischer Signalweg .....                                  | 20  |
| 1.6.3    Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)-Familie.....                           | 21  |
| 1.6.4    Caspase-3 .....  | 22  |
| 1.7    Entzündung .....   | 23  |
| 1.7.1    Allgemeines .....  | 23  |
| 1.7.2    Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ).....                       | 23  |
| 1.7.3    Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF).....            | 24  |
| 1.7.4    Interleukin-6 (IL-6).....  | 26  |
| 1.7.5    Cyclooxygenase-2 (COX-2) .....                                   | 28  |
| 1.7.6    Tumornekrosefaktor (TNF).....                                    | 30  |
| 1.8    Mitochondrien.....   | 31  |

---

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1.9     | Ziele und Fragestellung der Arbeit .....   | 34 |
| 2       | Material und Methoden .....  | 35 |
| 2.1     | Material .....   | 35 |
| 2.1.1   | Geräte .....   | 35 |
| 2.1.2   | Verbrauchsmaterialien .....  | 36 |
| 2.1.3   | Reagenzien und Substanzen .....  | 36 |
| 2.1.4   | Verwendete Kits .....  | 38 |
| 2.1.5   | Antikörper .....   | 39 |
| 2.1.6   | Primer .....   | 40 |
| 2.1.7   | Software .....   | 41 |
| 2.2     | Methoden .....   | 42 |
| 2.2.1   | Intermittierender Kältestress (ICS)-Mausmodell .....   | 42 |
| 2.2.2   | Materialgewinnung und Materialvorbereitung .....   | 42 |
| 2.2.3   | Färbungen .....  | 44 |
| 2.2.3.1 | Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin/Eosin .....  | 44 |
| 2.2.3.2 | Kapillarfärbung mit Lectin von <i>Bandeiraea simplicifolia</i> (Isolectin B <sub>4</sub> ) ..... | 45 |
| 2.2.3.3 | ATPase-Färbung .....   | 46 |
| 2.2.3.4 | Perjodsäure-Schiff-Reaktion-Färbung .....  | 48 |
| 2.2.3.5 | $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung .....   | 49 |
| 2.2.3.6 | Immunhistochemische Einfachfärbungen .....   | 51 |
| 2.2.3.7 | Immunhistochemische Doppelfärbungen .....  | 53 |
| 2.2.4   | Molekularbiologische Analyse der Muskelbiopsieproben .....                                       | 55 |
| 2.2.4.1 | Übersicht .....  | 55 |
| 2.2.4.2 | Extraktion der RNA .....   | 55 |
| 2.2.4.3 | Reverse Transkriptase-Reaktion .....   | 58 |
| 2.2.4.4 | Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) .....   | 60 |
| 2.2.5   | Elektronenmikroskopie .....  | 62 |
| 2.2.5.1 | Übersicht .....  | 62 |
| 2.2.5.2 | Einbettung der Muskelproben .....  | 62 |
| 2.2.5.3 | Anfertigung der Ultradünnschnitte, Kontrastierung und Bildaufnahme .....                         | 64 |
| 2.2.6   | Auswertungen .....   | 65 |
| 2.2.6.1 | Färbungen .....  | 65 |
| 2.2.6.2 | Molekularbiologische Analyse der Muskelbiopsieproben .....                                       | 71 |
| 2.2.6.3 | Elektronenmikroskopie .....  | 71 |
| 2.2.6.4 | Statistische Analyse, Berechnung und Visualisierung der Ergebnisse .....                         | 72 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3       | Ergebnisse .....  | 73  |
| 3.1     | Gewicht der Mäuse .....   | 73  |
| 3.2     | Ergebnisse der Untersuchungen des M. gastrocnemius.....   | 73  |
| 3.2.1   | Untersuchung der Kapillarisation und Angiogenese.....   | 73  |
| 3.2.2   | Bestimmung der mittleren Faserdichte, der mittleren Faserfläche und der Fasertypkomposition.....  | 76  |
| 3.2.3   | Ergebnisse der PAS-Färbung .....  | 78  |
| 3.2.4   | Wirkung von ICS auf inflammatorische Parameter .....  | 78  |
| 3.2.4.1 | IL-1 $\beta$ .....  | 78  |
| 3.2.4.2 | Cyclooxygenase 2 .....  | 79  |
| 3.2.4.3 | MIF.....  | 79  |
| 3.2.4.4 | CD68 .....  | 80  |
| 3.2.4.5 | IL-6 und TNF .....  | 80  |
| 3.2.5   | Wirkung von ICS auf Atrophie-relevante Marker.....  | 81  |
| 3.2.5.1 | MuRF1 .....   | 81  |
| 3.2.5.2 | Fbxo32 .....  | 84  |
| 3.2.6   | Korrelationen zwischen der Dichte an MIF <sup>+</sup> -, CD68 <sup>+</sup> -, IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> -, MuRF1 <sup>+</sup> - bzw. Fbxo32 <sup>+</sup> -Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius..... | 86  |
| 3.2.7   | Wirkung von ICS auf Apoptose-relevante Gene.....  | 87  |
| 3.2.8   | Einfluss von ICS auf die Innervation .....  | 88  |
| 3.2.9   | Analyse der Mitochondrien.....  | 90  |
| 3.2.9.1 | Anzahl und Größe der Mitochondrien .....  | 90  |
| 3.2.9.2 | Bewertung der Morphologie der Mitochondrien .....   | 91  |
| 3.2.9.3 | Superoxiddismutase 2 (Sod2).....  | 93  |
| 3.3     | Ergebnisse der Untersuchungen des M. soleus .....   | 94  |
| 3.3.1   | Untersuchung der Kapillarisation und Angiogenese.....   | 94  |
| 3.3.2   | Bestimmung der mittleren Faserdichte, der mittleren Faserfläche und der Fasertypkomposition.....  | 97  |
| 3.3.3   | Ergebnisse der PAS-Färbung .....  | 100 |
| 3.3.4   | Wirkung von ICS auf inflammatorische Parameter.....   | 100 |
| 3.3.4.1 | IL-1 $\beta$ .....  | 100 |
| 3.3.4.2 | Cyclooxygenase 2 .....  | 101 |
| 3.3.4.3 | MIF.....  | 102 |
| 3.3.4.4 | CD68 .....  | 103 |
| 3.3.4.5 | IL-6 und TNF .....  | 103 |

|         |   |        |
|---------|---|--------|
| 3.3.5   | Wirkung von ICS auf Atrophie-relevante Marker .....   | 104    |
| 3.3.5.1 | MuRF1 .....   | 104    |
| 3.3.5.2 | Fbxo32 .....  | 107    |
| 3.3.6   | Korrelationen zwischen der Dichte an MIF <sup>+</sup> -, CD68 <sup>+</sup> -, IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> -, MuRF1 <sup>+</sup> - bzw. Fbxo32 <sup>+</sup> -Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. soleus ..... | 109    |
| 3.3.7   | Wirkung von ICS auf Apoptose-relevante Marker .....   | 110    |
| 3.3.8   | Einfluss von ICS auf die Innervation .....  | 111    |
| 3.3.9   | Analyse der Mitochondrien.....  | 112    |
| 3.3.9.1 | Untersuchung von Anzahl und Größe der Mitochondrien.....  | 112    |
| 3.3.9.2 | Bewertung der Morphologie der Mitochondrien .....   | 114    |
| 3.3.9.3 | Superoxiddismutase 2 (Sod2).....  | 115    |
| 4       | Diskussion.....   | 117    |
| 4.1     | Intermittierender Kältestress (ICS)-Mausmodell .....  | 117    |
| 4.2     | Faserdichte, Faserfläche und Fasertypkomposition .....  | 118    |
| 4.3     | Angiogenese .....   | 120    |
| 4.4     | Inflammation .....  | 123    |
| 4.4.1   | IL-1 $\beta$ .....  | 123    |
| 4.4.2   | COX-2.....  | 124    |
| 4.4.3   | MIF.....  | 124    |
| 4.4.4   | CD68 .....  | 125    |
| 4.4.5   | IL-6.....   | 125    |
| 4.4.6   | TNF .....   | 127    |
| 4.5     | Atrophie und Apoptose.....  | 128    |
| 4.6     | Innervation .....   | 130    |
| 4.7     | Korrelationen zwischen der Dichte an MIF <sup>+</sup> -, CD68 <sup>+</sup> -, IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> -, MuRF1 <sup>+</sup> - bzw. Fbxo32 <sup>+</sup> -Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakten .....                             | 130    |
| 4.8     | Mitochondrien.....  | 132    |
| 5       | Zusammenfassung.....  | 136    |
| 6       | Summary .....   | 139    |
|         | Anhangsverzeichnis.....   | XVI    |
|         | Anhang .....  | XVIII  |
|         | Literaturverzeichnis.....   | XLV    |
|         | Eigene Publikationen.....   | XCVI   |
|         | Verzeichnis der akademischen Lehrer .....   | XCVII  |
|         | Danksagung.....   | XCVIII |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| °C                 | Grad Celsius  |
| µg                 | Mikrogramm  |
| µl                 | Mikroliter  |
| µm                 | Mikrometer  |
| A. dest.           | <i>Aqua destillata</i> - destilliertes Wasser   |
| ACR                | <i>American College of Rheumatology</i>   |
| Actb               | Beta-Aktin  |
| ADAM               | <i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i> - ein Disintegrin und Metallopro-<br>teinase                   |
| ADP                | Adenosindiphosphat  |
| Apaf-1             | <i>Apoptotic protease activating factor 1</i>   |
| ATP                | Adenosintriphosphat   |
| AWMF               | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesell-<br>schaften                          |
| Bak                | <i>Bcl-2-antagonist/killer-1</i>  |
| Bax                | <i>Bcl-2 associated X protein</i>   |
| Bcl-2              | <i>B-cell lymphoma 2</i>  |
| BH3                | <i>Bcl-2 homology 3</i>   |
| Bid                | <i>BH3 interacting-domain-death agonist</i>   |
| Bik                | <i>Bcl-2-interacting killer</i>   |
| Bim                | <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>   |
| bp                 | Basenpaare  |
| BSI-B <sub>4</sub> | Bandeiraea simplicifolia Isolectin B <sub>4</sub>   |
| CaCl <sub>2</sub>  | Calciumchlorid  |
| CAD                | <i>Caspase activated DNase</i>  |
| Casp3              | Caspase-3   |
| Caspase            | <i>CysteinyI-aspartate specific protease</i>  |
| CD                 | <i>Cluster of differentiation</i>   |
| cDNA               | <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> - komplementäre Desoxyribo-<br>nukleinsäure                    |
| Chrna1             | <i>Cholinergic receptor, nicotinic, α polypeptide 1</i> - Nikotinerger Acetylcho-<br>linrezeptor, alpha 1 |
| CIS                | <i>Cytokine-inducible SH2-containing protein</i>  |
| CoCl <sub>2</sub>  | Cobaltdichlorid, Cobalt(II)-chlorid   |
| COX                | Cyclooxygenase  |
| Ct                 | Threshold cycle   |
| DAB                | Diaminobenzidin   |
| DBA                | 2-DodecenyI-Bernsteinsäureanhydrid  |
| DII-1-4            | <i>Delta-like proteins 1-4</i>  |
| DNA                | <i>Deoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| DNase                         | Desoxyribonuklease  |
| dNTP                          | Desoxyribonucleosidtriphosphat  |
| DTT                           | Dithiothreitol  |
| EDTA                          | <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> - Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EGF                           | <i>Epidermal growth factor</i> - epidermaler Wachstumsfaktor              |
| eIF3-f                        | <i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F</i>               |
| ERK                           | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>                             |
| Fbxo32                        | <i>F-box only protein 32</i>  |
| FCSA                          | <i>Fiber cross sectional area</i> - Faserquerschnittsfläche               |
| FERM                          | <i>4.1 protein, ezrin, radixin, moesin</i>                                |
| Flk1                          | <i>Fetal liver kinase-1</i>   |
| Flt1                          | <i>Fms-like tyrosine kinase 1</i>   |
| Flt4                          | <i>Fms-related tyrosine kinase 4</i>                                      |
| FM                            | <i>Fibromyalgia</i> - Fibromyalgie  |
| FMS                           | Fibromyalgie-Syndrom  |
| FOXO                          | Forkhead-Box-Proteine der Subklasse O                                     |
| g                             | Gramm   |
| Gapdh                         | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                                  |
| GAS                           | <i>Interferon-gamma activated site</i>                                    |
| GH                            | <i>Growth Hormone</i> - Wachstumshormon                                   |
| Gp                            | Glykoprotein  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid  |
| HCL                           | Salzsäure   |
| HECT                          | <i>Homology to E6AP C terminus</i>  |
| HE-Färbung                    | Hämatoxylin-Eosin-Färbung   |
| HES                           | <i>Hairy and enhancer of split</i>  |
| HEY                           | <i>Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif</i>                    |
| HIF-1                         | <i>Hypoxia-inducible factor-1</i> – Hypoxie-induzierter Faktor 1          |
| HRE                           | <i>Hypoxia-responsible element</i> – Hypoxie-responsives Element          |
| IAP                           | <i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>                                    |
| ICAD                          | <i>Inhibitor of caspase-activated DNase</i>                               |
| ICAM-1                        | <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>                                  |
| ICE                           | <i>IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme</i>                           |
| IHC                           | Immunhistochemie  |
| ICS                           | <i>Intermittent cold stress</i> - intermittierender Kältestress           |
| IFN- $\gamma$                 | Interferon- $\gamma$  |
| IGF-1                         | <i>Insuline-like-growth-factor-1</i> - Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 |
| IL                            | Interleukin   |
| IL-1-R                        | IL-1-Rezeptor   |
| IL-6-R                        | IL-6-Rezeptor   |
| JAK                           | Januskinase   |
| KCL                           | Kaliumchlorid   |
| kDa                           | Kilodalton  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| KDR               | <i>Kinase insert domain receptor</i>   |
| KOH               | Kaliumhydroxid   |
| l                 | Liter  |
| LDH               | Lactatdehydrogenase  |
| LNR               | <i>Lin-12/Notch-repeats</i>  |
| LPS               | Lipopolysaccharide   |
| M                 | Molar  |
| M.                | <i>Musculus</i> - Muskel   |
| MAFbx             | <i>Muscle Atrophy F-box</i>  |
| MAP               | <i>Mitogen-activated protein</i>   |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid   |
| MIF               | Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor   |
| mIGF-1            | <i>Muscle-restricted insulin-like growth factor 1</i>                                |
| Min               | Minute   |
| mL                | Milliliter   |
| mM                | Millimolar   |
| mm                | Millimeter   |
| mm <sup>3</sup>   | Kubikmillimeter  |
| MNA               | 1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureanhydrid                                       |
| MPC               | <i>Mitochondrial pyruvate carrier</i> - mitochondrialer Pyruvatträger                |
| mRNA              | <i>Messenger RNA</i> – Boten-RNA   |
| mTOR              | <i>Mammalian target of rapamycin</i>   |
| MuRF1             | <i>Muscle ring finger 1</i>  |
| n                 | normal   |
| NaOH              | Natronlauge  |
| NF-κB             | <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>                |
| NICD              | Notch intracellular domain   |
| nm                | Nanometer  |
| NRP               | Neuropilin   |
| NSS               | Normales Schweineserum   |
| OsO <sub>4</sub>  | Osmiumtetroxid, Osmium(VIII)-oxid  |
| PAS               | <i>Periodic acid- Schiff reaction</i> - Perjodsäure-Schiff-Reaktion                  |
| PBMC              | <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> – mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS               | <i>Phosphat Buffered Saline</i> - phosphatgepufferte Kochsalzlösung                  |
| PEST              | Prolin, Glutamat, Serin, Threonin  |
| PFA               | Paraformaldehyd  |
| PGD <sub>2</sub>  | Prostaglandin D <sub>2</sub>   |
| PGE <sub>2</sub>  | Prostaglandin E <sub>2</sub>   |
| PGF <sub>2α</sub> | Prostaglandin F <sub>2α</sub>  |
| PGG <sub>2</sub>  | Prostaglandin G <sub>2</sub>   |
| PGH <sub>2</sub>  | Prostaglandin H <sub>2</sub>   |
| PGI <sub>2</sub>  | Prostaglandin I <sub>2</sub>   |

|                |  |
|----------------|--|
| PI3K           | Phosphatidylinositol 3-kinase  |
| PI3K/AKT/mTOR  | <i>Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin</i>   |
| PIGF           | <i>Placental Growth Factor</i> – plazentarer Wachstumsfaktor   |
| POD            | Peroxidase   |
| PPAR           | <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> - Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor                                     |
| qRT-PCR        | <i>Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> - quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion |
| RBPJk          | <i>Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J</i>   |
| RBR            | <i>Ring-between-Ring</i>   |
| Rbx1           | <i>RING-box protein 1</i>  |
| RIN            | <i>RNA Integrity number</i> - RNA-Integritätsnummer  |
| RING           | <i>Really interesting new gene</i>   |
| RNA            | <i>Ribonucleic acid</i> - Riboneukleinsäure  |
| RNase          | Ribonuklease   |
| ROS            | <i>Reactive oxygen species</i> - reaktive Sauerstoffspezies  |
| ROX            | 6-Carboxy-X-Rhodamin   |
| Rpl32          | <i>Ribosomal protein L32</i>   |
| RT             | Reverse Transkriptase  |
| s              | Sekunde  |
| S6K1           | <i>Ribosomal protein S6 kinase 1</i>   |
| SCF            | <i>Skp, Cullin, F-box protein</i>  |
| SEM            | <i>Standard Error of the Mean</i> - Standardfehler des Mittelwertes  |
| SH2            | <i>Scr homology 2</i>  |
| sIL-6-R        | <i>Soluble IL-6-receptor</i> - löslicher IL-6-Rezeptor   |
| Skp-1          | <i>S-phase kinase-associated protein1</i>  |
| Smac           | <i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>   |
| Socs           | <i>Supressor of Cytokine Signaling</i>   |
| Sod2           | Superoxiddismutase 2   |
| STAT           | <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>  |
| t              | Zeit   |
| TACE           | <i>TNF-<math>\alpha</math> Converting Enzyme</i> - TNF- $\alpha$ konvertierendes Enzym   |
| Taq-Polymerase | <i>Thermus aquaticus</i> - Polymerase  |
| Tbp            | <i>TATA box binding protein</i>  |
| TGF- $\beta$ 1 | <i>Transforming growth factor beta 1</i>   |
| TNF            | Tumornekrosefaktor   |
| TNFR           | TNF-Rezeptor   |
| Tr1            | <i>Type 1 regulatory T cells</i>   |
| Tris           | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| TYK2           | Tyrosinkinase 2  |
| U              | Unit   |
| VEGF           | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> - vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor   |



|       |               |
|-------|---------------|
| VEGFR | VEGF-Rezeptor |
|-------|---------------|

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen VEGF-Rezeptoren und Liganden.....  | 8  |
| Abbildung 2: Übersicht über den Notch-Notch-Ligand- Signalweg in Endothelzellen .....  | 11 |
| Abbildung 3: Übersicht über die Interaktionen zwischen dll-4/ Notch und VEGF/VEGFR-2 .....   | 13 |
| Abbildung 4: Substrate der verschiedenen Abbauwege von Muskelproteinen .....   | 15 |
| Abbildung 5: Übersicht über das Ubiquitin-Proteasom-System .....   | 15 |
| Abbildung 6: Übersicht über die an der Fbxo32 vermittelten Muskelatrophie beteiligten<br>Faktoren .....                                      | 18 |
| Abbildung 7: Übersicht über den intrinsischen und extrinsischen Signalweg der Apoptose .....   | 21 |
| Abbildung 8: Übersicht der Prostaglandinproduktion durch COX-1 und -2.....   | 29 |
| Abbildung 9: Übersicht über den Aufbau eines Mitochondriums .....  | 32 |
| Abbildung 10: Behandlungsverlauf der ICS-Tiere. ....   | 42 |
| Abbildung 11: Übersicht über ein Muskelpräparat. HE-Färbung.....   | 44 |
| Abbildung 12: Übersicht über ein Muskelpräparat. ATPase-Färbung. ....  | 47 |
| Abbildung 13: Übersicht über die Vorgehensweise zur molekularbiologischen Analyse der<br>Muskelbiopsieproben.....                            | 55 |
| Abbildung 14: Messung der Integrität der RNA. ....   | 57 |
| Abbildung 15: Bestimmung der RNA-Qualität mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100. ....   | 58 |
| Abbildung 16: Beispielbilder zur Auswertung der Kapillarisation in der BSI-B <sub>4</sub> -Lectin-Färbung.<br>.....                          | 66 |
| Abbildung 17: Darstellung der verschiedenen Muskelfasertypen im M. soleus mittels ATPase-<br>Färbung. ....                                   | 67 |
| Abbildung 18: Beispiel der Zuordnung der BSI-B <sub>4</sub> -Lectin-Färbung zur ATPase-Färbung im M.<br>gastrocnemius und im M. soleus. .... | 68 |
| Abbildung 19: Einteilung der Fasern bezüglich des Glykogengehalts anhand der Intensität in<br>der PAS-Färbung.....                           | 69 |
| Abbildung 20: Beispiele der $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung.....  | 69 |
| Abbildung 21: Morphologische Einteilung der Mitochondrien. ....  | 72 |
| Abbildung 22: Tiergewicht. ....  | 73 |
| Abbildung 23: Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius.....   | 74 |
| Abbildung 24: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach BSI-B <sub>4</sub> -Lectin-Färbung.<br>.....                              | 75 |
| Abbildung 25: Relative Expression (qRT-PCR) von Angiogenese-Genen im M. gastrocnemius..  | 76 |
| Abbildung 26: Faserdichte (n/mm <sup>2</sup> ) im M. gastrocnemius. ....   | 77 |
| Abbildung 27: Muskelfaserquerschnittsfläche (in $\mu\text{m}^2$ ) im M. gastrocnemius.....   | 78 |
| Abbildung 28: MIF-Expression im M. gastrocnemius.....  | 80 |
| Abbildung 29: Relative Expressionen (qRT-PCR) der IL-6- und TNF-Gene im M. gastrocnemius   | 81 |

|   |     |
|---|-----|
| Abbildung 30: MuRF1 im M. gastrocnemius.....  | 82  |
| Abbildung 31: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-MuRF1-Antikörpern .....                               | 83  |
| Abbildung 32: Fbxo32 im M. gastrocnemius.....   | 84  |
| Abbildung 33: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-Fbxo32-Antikörpern .....                              | 85  |
| Abbildung 34: Relative Expression (qRT-PCR) des Chrna1-Gens im M. gastrocnemius.....  | 89  |
| Abbildung 35: Mitochondriendichte ( $n/\mu\text{m}^2$ ) im M. gastrocnemius. ....   | 90  |
| Abbildung 36: Mitochondrienquerschnittsfläche (in $\text{nm}^2$ ) im M. gastrocnemius. ....   | 91  |
| Abbildung 37: Morphologie der Mitochondrien im M. gastrocnemius.....  | 92  |
| Abbildung 38: Exemplarische, elektronenmikroskopische Bilder des M. gastrocnemius zur Beurteilung der Morphologie der Mitochondrien ..... | 92  |
| Abbildung 39: Relative Expression (qRT-PCR) des Sod2-Gens im M. gastrocnemius .....   | 93  |
| Abbildung 40: Anzahl der Kapillarkontakte der verschiedenen Muskelfasertypen im M. soleus. ....   | 95  |
| Abbildung 41: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach BSI-B <sub>4</sub> -Lectin-Färbung. ....                                      | 96  |
| Abbildung 42: Relative Expression (qRT-PCR) von Angiogenese-Genen im M. soleus .....  | 97  |
| Abbildung 43: Faserdichte ( $n/\text{mm}^2$ ) im M. soleus. ....  | 98  |
| Abbildung 44: Querschnittsfläche pro Muskelfasertyp (in $\mu\text{m}^2$ ) im M. soleus.....   | 99  |
| Abbildung 45: Relative Expression (qRT-PCR) des IL-1 $\beta$ -Gens im M. soleus.....  | 101 |
| Abbildung 46: COX-2 im M. soleus.....   | 102 |
| Abbildung 47: MIF im M. soleus.....   | 103 |
| Abbildung 48: Relative Expression (qRT-PCR) des IL-6-Gens im M. soleus.....   | 104 |
| Abbildung 49: MuRF1 im M. soleus. ....  | 105 |
| Abbildung 50: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-MuRF1-Antikörpern .....                                      | 106 |
| Abbildung 51: Fbxo32 im M. soleus. ....   | 107 |
| Abbildung 52: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-Fbxo32-Antikörpern .....                                     | 108 |
| Abbildung 53: Relative Expression (qRT-PCR) des Chrna1-Gens im M. soleus .....  | 112 |
| Abbildung 54: Mitochondriendichte ( $n/\mu\text{m}^2$ ) im M. soleus.....   | 113 |
| Abbildung 55: Mitochondrienquerschnittsfläche (in $\text{nm}^2$ ) im M. soleus.....   | 113 |
| Abbildung 56: Morphologie der Mitochondrien im M. soleus. ....  | 114 |
| Abbildung 57: Exemplarische, elektronenmikroskopische Bilder des M. soleus zur Beurteilung der Morphologie der Mitochondrien.....         | 115 |
| Abbildung 58: Relative Expression (qRT-PCR) des Sod2-Gens im M. soleus.....   | 116 |

## Tabellenverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.....  | 35  |
| Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....   | 36  |
| Tabelle 3: Liste der verwendeten Reagenzien und Substanzen.....   | 36  |
| Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits.....  | 38  |
| Tabelle 5: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit den eingesetzten Konzentrationen.....   | 39  |
| Tabelle 6: Liste der verwendeten Primer.....  | 40  |
| Tabelle 7: Liste der verwendeten Software.....  | 41  |
| Tabelle 8: qRT-PCR: Übersicht des Amplifizierungsprogramms.....   | 61  |
| Tabelle 9: Korrelationen zwischen der Dichte MIF <sup>+</sup> , CD68 <sup>+</sup> , IL-1β <sup>+</sup> , MuRF1 <sup>+</sup> bzw. Fbxo32 <sup>+</sup> -Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere.....  | 86  |
| Tabelle 10: Korrelationen zwischen der Dichte MIF <sup>+</sup> , CD68 <sup>+</sup> , IL-1β <sup>+</sup> , MuRF1 <sup>+</sup> bzw. Fbxo32 <sup>+</sup> -Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere..... | 87  |
| Tabelle 11: Korrelationen zwischen MIF <sup>+</sup> , CD68 <sup>+</sup> , IL-1β <sup>+</sup> , MuRF1 <sup>+</sup> bzw. Fbxo32 <sup>+</sup> -Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. soleus männlicher ICS-Tiere.....                   | 109 |
| Tabelle 12: Korrelationen zwischen MIF <sup>+</sup> , CD68 <sup>+</sup> , IL-1β <sup>+</sup> , MuRF1 <sup>+</sup> bzw. Fbxo32 <sup>+</sup> -Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. soleus weiblicher ICS-Tiere.....                   | 110 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Fibromyalgie-Syndrom: Definition und Epidemiologie

Das Fibromyalgie-Syndrom (FMS) gehört zu den chronischen Schmerzsyndromen, dessen Ursache und Pathogenese bis heute weitgehend unklar sind. Auch die Diagnosestellung ist häufig schwierig, da die Symptome vielgestaltig sein können.

So zeigte eine Studie, dass Patienten mit FMS am häufigsten unter Muskelschmerzen wechselnder Lokalisation, Rückenschmerzen, Müdigkeit, Gelenkschmerzen wechselnder Lokalisation, dem Gefühl, schlecht geschlafen zu haben, Morgensteifigkeit und Zerschlagenheit am Morgen leiden (Häuser et al., 2008). Ferner ertragen sie auch häufiger Parästhesien, Kopfschmerzen und Ängstlichkeit, seltener auch Reizdarmsyndrom, Sicca-Syndrom und Raynaud-Syndrom (Wolfe et al., 1990). Typisch ist zudem eine deutlich verminderte Schmerzschwelle gegenüber Druck-, Hitze- und Kältereizen (Kosek et al., 1996; Lautenbacher et al., 1994).

In der Literatur wird eine Prävalenz des FMS in den USA von 2,0 % (3,4 % der Frauen, 0,5 % der Männer (Wolfe et al., 1995), 1,3 % in Schweden (2,4 % der Frauen, 0,0 % der Männer) (Lindell et al., 2000) und 3,3% in Kanada (4,9 % der Frauen, 1,6 % der Männer) (White et al., 1999) beschrieben.

Neben der Präferenz des weiblichen Geschlechts zeigt sich ferner auch eine Altersabhängigkeit. So steigt die Prävalanz des FMS mit dem Alter deutlich an und beträgt bei Frauen zwischen 70 und 79 Jahren 7,4 % und bei gleichaltrigen Männern 1,2 % (Wolfe et al., 1995).

Neben der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit besteht auch eine familiäre Häufung des FMS (Buskila et al., 1996; Arnold et al., 2004).

## 1.2 FMS: Diagnosestellung

In Deutschland ist es derzeit möglich, die klinische Diagnose entweder nach den ACR (The American College of Rheumatology)-Kriterien aus dem Jahr 1990 (Wolfe et al., 1990) ([Anhang A-1](#)), die vor allem auch in wissenschaftlichen Untersuchungen

verwendet werden, nach den vorläufig modifizierten ACR-Kriterien aus dem Jahre 2010 (Wolfe et al., 2010) ([Anhang A-2](#)) oder nach den symptom-basierten Kriterien der S3-Leitlinie zum FMS (AWMF-Kriterien) (Häuser et al., 2010) ([Anhang A-3](#)) zu stellen (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2012; Eich et al., 2012).

Nach den ACR-Kriterien von 1990 liegt ein FMS vor, wenn die Schmerzen seit mindestens drei Monate vorhanden sind. Sie müssen ferner ausgedehnt sein (engl. „*widespread pain*“). Das heißt, der Schmerz muss zum einen in der rechten als auch in der linken Körperhälfte auftreten. Zum anderen muss er oberhalb wie auch unterhalb der Taille spürbar sein. Zudem muss auch das Achsenskelett schmerzhaft betroffen sein. Zugleich müssen noch elf von 18 sogenannter „Tenderpoints“ bei digitaler Palpation mit einem definierten Druck von circa 4 kg schmerzhaft sein, um die Diagnose stellen zu können (Wolfe et al., 1990).

Da Patienten mit FMS besonders in der Primärversorgung gesehen werden, ist es wichtig, dass es Diagnosekriterien gibt, die auch zuverlässig angewendet werden können. Aber gerade die regelrechte Diagnosestellung des FMS anhand der ACR-Kriterien von 1990 kann in der Primärversorgung häufig nicht gewährleistet werden (Fitzcharles und Boulos, 2003).

Deshalb wurde von dem ACR im Jahr 2010 die vorläufigen Diagnosekriterien für Fibromyalgie (Wolfe et al., 2010) eingeführt, bei denen auf eine körperliche Untersuchung und dem Testen der „Tenderpoints“ verzichtet und neben den Schmerzen noch auf allgemeine Symptome, die häufig beim FMS auftreten, eingegangen wird ([Anhang A-2](#)).

### **1.3 FMS: Hypothesen zur Ätiologie**

Zur Ätiologie und Pathogenese des FMS gibt es viele unterschiedliche Hypothesen, die in noch mehr verschiedenen Studien untersucht wurden, bisher aber noch zu keinem klaren Ergebnis geführt haben.

Die älteste Hypothese ist wohl die, dass strukturelle und morphologische Veränderungen der Muskulatur selbst zu der Symptomatik führen. Hierzu wurden viele

Studien durchgeführt, die zum einen Veränderungen z.B. der mittleren Muskelfaserfläche, der Muskelfaserdichte, der Muskelfasertypkomposition, der Kapillarisation, des Kollagengehalts und des Glykogengehalts in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten zeigen und zum anderen ausschließen (Bengtsson et al., 1986a; Drewes et al., 1993; Yunus et al., 1989a; Lindh et al., 1995; Lindman et al., 1995; Gronemann et al., 2004; Sprott et al., 2004; Gadallah et al., 2013; Sriksuea et al., 2013). Aktuell wird allgemein die Meinung vertreten, dass kein Zusammenhang zwischen FMS und strukturellen Muskelveränderungen existiert (Sommer et al., 2012).

Eine weitere These ist, dass ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen eine Rolle in der Pathogenese des FMS darstellen könnte. Es wurden sehr viele verschiedene Untersuchungen mit teilweise unterschiedlichen Ergebnissen dazu durchgeführt. Eine gute Übersicht gibt hierzu ein systematisches Review mit Metaanalyse aus dem Jahre 2011 (Uçeyler et al., 2011): dieses kommt zu dem Ergebnis, dass bei FMS-Patienten ein höheres Serumlevel an IL-1-Rezeptor-Antagonist, IL-6 und IL-8 und höhere Plasmakonzentrationen an IL-6 und IL-8 vorliegen.

Auch wurden Vermutungen angestellt, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhten Zytokinleveln und mitochondrialer Dysfunktion besteht (Cordero et al., 2013).

So könnte oxidativer Stress, induziert durch reaktive Sauerstoffspezies (engl. „*reactive oxygen species*“ [ROS]), die Symptomatik des FMS herbeiführen (Bagis et al., 2005; Castro-Marrero et al., 2013; Cordero et al., 2013; Cordero et al., 2012; Cordero et al., 2010). Eine Dysfunktion der Mitochondrien wird hierbei vermutet (Castro-Marrero et al., 2013; Cordero et al., 2012; Cordero et al., 2010; Cordero et al., 2013; Drewes et al., 1993; Gadallah et al., 2013; Sprott et al., 2004).

Weiterhin wurden metabolische Veränderungen in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten, die energiehaltige Phosphatverbindungen (Bengtsson et al., 1986b; Gerdle et al., 2013; Park et al., 1998; Sprott et al., 2000), die Sauerstoffversorgung (Lund et al., 1986; Elvin et al., 2006; McIver et al., 2006; Shang et al., 2012) und den Lactat-Pyruvat-Stoffwechsel (Gerdle et al., 2010) betreffen, gefunden.

Ferner konnten bei Patienten mit FMS Veränderungen entdeckt werden, die auf eine abnorme zentrale Schmerzverarbeitung hinweisen. Beispielsweise ist die Durchblutung

von Hirnarealen, die in der Schmerzverarbeitung involviert sind, bei Patienten verändert (Bradley et al., 1999; Duschek et al., 2012; Foerster et al., 2011; Gracely et al., 2002; Guedj et al., 2007; Guedj et al., 2008; Kwiatak et al., 2000; Mountz et al., 1995). Zusätzlich wurden auch Konzentrationsunterschiede von Substanz P und Serotonin im Liquor von FMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden (Russell et al., 1992; Russell et al., 1994; Vaerøy et al., 1988). Auch wurden durch mehrwöchiges aerobes Training Veränderungen im Substanz P-Level im Liquor von FMS-Patienten dokumentiert. Diese Veränderung war mit einer Veränderung der Schmerzgrenze verbunden (Bjersing et al., 2012). Zudem bestand eine negative Korrelation zwischen der Anzahl an schmerzhaften Körperregionen und dem Serum-Serotonin und eine positive Korrelation zwischen Serum-Serotonin und Druckschmerzhaftigkeit (Ernberg et al., 1999). Jedoch konnte die Frage, ob die Neuropeptide Serotonin und Substanz P auch in der Muskulatur von FMS-Patienten produziert werden und sich von Kontrollen unterscheiden, mittels RT-PCR und Immunhistochemie in einer Studie verneint werden (Sprott et al., 1998).

Die hier aufgeführten Beispiele, zusammen mit den erniedrigten Schmerzschwellen (Kosek et al., 1996; Lautenbacher et al., 1994) und dem Nachweis eines Wind-Up-Phänomens in Patienten (Staud et al., 2001) sprechen für eine veränderte Schmerzverarbeitung von Patienten mit FMS. Auch eine zentrale Sensibilisierung wird in Betracht gezogen (Desmeules et al., 2003; Staud und Smitherman, 2002).

Der Nachweis von veränderten zentralen Schmerzprozessen kann jedoch nicht die Frage beantworten, ob das FMS primär eine Erkrankung des ZNS ist oder ob periphere Einflüsse zu den ZNS-Veränderungen führen. Es wird jedoch stark angenommen, dass periphere Einflüsse zumindest teilweise Einfluss auf das FMS haben (Staud, 2010; Affaitati et al., 2011). Eine zentrale Sensibilisierung könnte durch peripheren Input aus dem Muskelgewebe (Staud et al., 2009), durch myofascialen Triggerpunkte (Ge et al., 2009; Ge et al., 2010) oder durch das periphere Nervensystem (Albrecht et al., 2013; Caro et al., 2008; Stefano et al., 2000) unterhalten werden (Staud, 2010).

In dieser Arbeit sollen mit Hilfe von intermittierendem Kältestress im Rahmen eines FMS-Tiermodells strukturelle und morphologische Veränderungen der Skelettmuskulatur beim FMS untersucht werden. Hierzu wird auf die Morphologie und den Glykogengehalt, die Kapillarisation und Angiogenese, Entzündungs-, Atrophie-



und Apoptose-relevante Marker, die Innervation und Mitochondrien in der Skelettmuskulatur (M. gastrocnemius, M. soleus) von Mäusen in einem FMS-Modell eingegangen.

## **1.4 Angiogenese**

### **1.4.1 Allgemeines**

Die Bildung und Weiterentwicklung von Gefäßen unterliegen zwei verschiedenen Mechanismen, nämlich der Vaskulogenese und der Angiogenese.

Während die Vaskulogenese die Differenzierung von Angioblasten aus Mesoderm und die anschließende Bildung von primitiven Blutgefäßen aus den Angioblasten (Risau und Flamme, 1995) vor allem während der frühen Embryonalzeit bezeichnet, beschreibt die Angiogenese das Wachstum und den Umbau vorbestehender Gefäße durch Sprossung oder Spaltung (Risau, 1997). Die Angiogenese wird über verschiedene Faktoren gesteuert. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit untersuchten Angiogenese-relevanten Faktoren näher beschrieben.

### **1.4.2 Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Familie**

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (engl. "*Vascular Endothelial Growth Factor*" [VEGF]) ist ein für Endothelzellen hochspezifischer proliferationsfördernder Faktor (Ferrara und Henzel, 1989).

Die VEGF-Familie besteht aus mehreren Mitgliedern: VEGF-A–F und PlGF (engl. "*placental growth factor*") (Maglione et al., 1991; Meyer et al., 1999; Neufeld et al., 1999; Yamazaki et al., 2003; Yamazaki et al., 2005). Diese interagieren mit ihren jeweiligen Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, NRP-1, NRP-2), welche Transmembran-Tyrosinkinase-Rezeptoren darstellen und unterschiedliche Funktionen und Wirkungen vermitteln ([Abbildung 1](#)). Nach Bindung an den jeweiligen extrazellulären Teil des Rezeptors erfolgt die Dimerisation und Autophosphorylierung des intrazellulären Bereichs der Rezeptoren und eine nachfolgende Aktivierung einer Proteinkaskade (Otrock et al., 2007).

VEGF-A ist ein homodimerisches Glykoprotein, das durch ein einzelnes Gen kodiert wird. Durch alternatives Splicing der mRNA existieren von VEGF-A mehrere Isoformen, z.B. VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>206</sub> (Houck et al., 1991; Leung et al., 1989; Poltorak et al., 1997; Tischer et al., 1991), wobei VEGF-A<sub>165</sub> überwiegt (Otrock et al., 2007).

VEGF-B existiert in zwei Isoformen, die ebenfalls durch alternatives Splicing entstehen: VEGF-B<sub>167</sub> (Olofsson et al., 1996b) und VEGF-B<sub>186</sub> (Olofsson et al., 1996a). Es wird weit verbreitet exprimiert, vor allem aber in der Herz- und Skelettmuskulatur (Olofsson et al., 1996b).

Die verschiedenen VEGF-Familienmitglieder binden mit unterschiedlicher Affinität an die jeweiligen Rezeptoren.

Der Rezeptor VEGFR-1, der auch als fms-like tyrosine kinase 1 (Flt1) bezeichnet wird, besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Domäne und einer intrazellulären Domäne, die eine Tyrosinkinasedomäne enthält (Shibuya et al., 1990). Seine Expression wird bei Hypoxie durch den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (engl. „*hypoxia-inducible factor-1*“, [HIF-1]) hochreguliert (Gerber et al., 1997). HIF-1 wirkt über seine Bindung an HRE (engl. „*hypoxia-responsible element*“) im Promotorbereich des VEGF-Gens (Forsythe et al., 1996). An VEGFR-1 binden neben VEGF-A und VEGF-B (Olofsson et al., 1998) auch PlGF, welches nicht an VEGFR-2 bindet (Park et al., 1994). Er wird zusätzlich auf Endothelzellen (Yamane et al., 1994; Kaipainen et al., 1993) und Monozyten exprimiert und steuert so deren Migration (Barleon et al., 1996).

VEGF-A bindet mit höherer Affinität an VEGFR-1 als an VEGFR-2 (Waltenberger et al., 1994).

VEGFR-2, im Menschen auch KDR (engl. „*kinase insert domain receptor*“), in der Maus auch Flk-1 (engl. „*fetal liver kinase-1*“) genannt, besteht ebenso wie VEGFR-1 aus einer extrazellulären Domäne, einer einzigen transmembranen Region und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Region (Terman et al., 1991; Matthews et al., 1991). VEGFR-2 ist wohl der VEGF-Rezeptor, der den Haupteffekt für die Endothelproliferation vermittelt. Im Unterschied zu VEGFR-1 wird die Expression von VEGFR-2 nicht durch Hypoxie gesteigert (Gerber et al., 1997). Er bindet VEGF-A (Terman et al., 1992; Quinn et al., 1993), VEGF-C (Joukov et al., 1996), VEGF-D (Achen

et al., 1998), VEGF-E (Ogawa et al., 1998; Wise et al., 1999) und VEGF-F (Yamazaki et al., 2003). Exprimiert wird er vor allem auf Endothelzellen und deren Vorläufern mit der höchsten Expression während der Embryogenese (Millauer et al., 1993; Quinn et al., 1993).

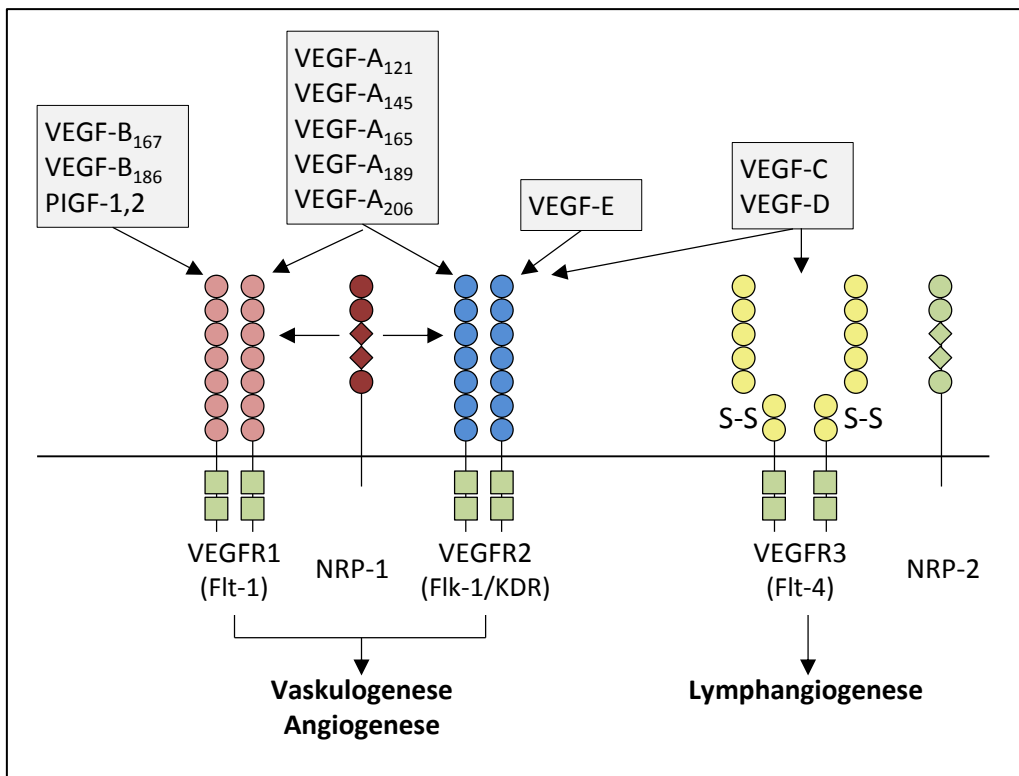
Durch die Aktivierung von VEGFR-1 wird die durch VEGFR-2 vermittelte Proliferation von Endothelzellen vermindert (Zeng et al., 2001). Während für VEGFR-2 ein direkter proliferationsfördernder Effekt nachgewiesen wurde, konnte ein solcher für VEGFR-1 nicht gefunden werden (Waltenberger et al., 1994). Allerdings wird eine indirekte Beeinflussung von Angio- und Lymphangiogenese über durch VEGFR-1 stimulierte Makrophagen und über eine durch VEGFR-1 erhöhte Endothelpermeabilität vermutet (Murakami et al., 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Aktivierung von VEGFR-2 als Signal für die Angiogenese, Förderung der Migration und erhöhte Gefäßpermeabilität der Endothelzellen im Gegensatz zur alleinigen Aktivierung von VEGFR-1 ausreichend ist (Gille et al., 2001). Ferner wurde durch Aktivierung von VEGFR-2 ein anti-apoptotischer Effekt auf Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene nachgewiesen (Gerber et al., 1998).

VEGFR-3, auch bezeichnet als Flt4 (engl. „*fms-related tyrosine kinase 4*“), wird beim erwachsenen Menschen vor allem auf Lymphgefäßen und einigen hochendothelialen Venolen exprimiert (Kaipainen et al., 1995). Seine Liganden sind VEGF-C (Joukov et al., 1996) und VEGF-D (Achen et al., 1998). Der VEGFR-3-Ligand VEGF-C wirkt spezifisch mitogen auf Lymphgefäße (Oh et al., 1997).

Neuropilin-1 (NRP-1) agiert als ein Co-Rezeptor für VEGFR-2. An Neuropilin-1 bindet VEGF-A<sub>165</sub> aber nicht VEGF-A<sub>121</sub>. Durch die Bindung wird die Affinität von VEGFR-2 für VEGF-A<sub>165</sub> gesteigert (Soker et al., 1998). Weiterhin fungiert Neuropilin-1 als Rezeptor für PlGF-2 (Migdal et al., 1998), VEGF-B (Makinen et al., 1999) und VEGF-E (Wise et al., 1999).

Neuropilin-2 (NRP-2) bindet PlGF-2, VEGF-C (Karkkainen et al., 2001), VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, aber nicht VEGF-A<sub>121</sub> (Gluzman-Poltorak et al., 2000).



**Abbildung 1:** Übersicht über die verschiedenen VEGF-Rezeptoren und Liganden (modifiziert nach Hicklin und Ellis, 2005).

### 1.4.3 “Suppressor of Cytokine Signaling (Socs)”-Familie

Familienmitglieder der (engl.) “Supressor of Cytokine Signaling (Socs)”-Familie sind die Hauptregulatoren des “Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT)-Signalwegs”. Bekannt sind die Proteine Socs1-7 und CIS (engl. “*cytokine-inducible SH2-containing protein*”) (Yoshimura et al., 1995; Starr et al., 1997; Hilton et al., 1998). Sie alle enthalten eine zentrale SH2 (engl. „*Scr homology 2*“-Domäne und eine sogenannte SOCS box an der C-terminalen Region (Starr et al., 1997; Hilton et al., 1998).

Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs ist wichtig für das Wachstum, das Überleben, die Entwicklung und die Differenzierung verschiedener Zellen, besonders aber für Immunzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems (Ghoreschi et al., 2009).

Bei Säugetieren existieren vier verschiedene JAKs: JAK1-3 und TYK2 (Tyrosinkinase 2). Sie zeichnen sich durch einen ähnlichen Aufbau aus: sie besitzen am N-Terminus eine FERM (4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne und eine SH2 -Domäne, die mit der intrazellulären Domäne des Zytokin-Rezeptors interagieren (Wallweber et al., 2014).

Am C-Terminus besitzen sie eine Pseudokinase- und Kinase-Domäne (Wilks et al., 1991).

Der JAK/STAT-Signalweg wird aktiviert, wenn ein Zytokin an seinen jeweiligen Rezeptor bindet. Z.B. verändert der konstitutiv als Dimer vorliegende GH (engl. „*growth hormone*“)-Rezeptor nach GH-Bindung seine Konformation. Hierdurch wird die Pseudokinase-inhibierende Domäne eines JAK2, welches die Kinase-Domäne des zweiten JAK2 inhibiert, entfernt und so JAK2 aktiviert (Brooks et al., 2014).

Im Anschluss werden Tyrosinreste des Rezeptors durch die JAKs phosphoryliert. Nun kann der Rezeptor mit der SH2-Region eines STAT-Proteins interagieren. Die STAT-Proteine werden durch Phosphorylierung aktiviert, dissoziieren vom Rezeptor ab, dimerisieren, translozieren in den Nukleus, binden über Mitglieder der GAS (engl. „*Interferon-gamma activated site*“) an die DNA und aktivieren die Genexpression (Schindler und Darnell, 1995; Kisseleva et al., 2002; O'Shea et al., 2002).

Socs3 inhibiert JAK1, JAK2 und TYK2 direkt, aber nicht JAK3 (Babon et al., 2012). Die Bindung von Socs3 erfolgt gleichzeitig an JAK2 und den jeweiligen Zytokin-Rezeptor, wobei vermutet wird, dass diese simultane Bindung von JAK und Rezeptor auch für JAK1 und TYK2 zutrifft (Kershaw et al., 2013). Die Expression von Socs3 wird stimuliert durch z.B. TNF- $\alpha$  (Emanuelli et al., 2001), IL-6, Lipopolysaccharide (LPS) (Lebel et al., 2000) und GH (Adams et al., 1998), gehemmt wird sie beispielsweise durch Hypoxie (Yokogami et al., 2013). Eine Übersicht der Zytokine, die Socs3 induzieren und deren Wirkungen von Socs3 inhibiert werden, liefert eine Publikation aus dem Jahre 2002 in Tabellenform (Alexander, 2002). Reguliert wird die Expression der Socs-Gene ebenfalls durch STAT-Proteine. So besitzt der Socs3-Promotor Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 (Auernhammer et al., 1999) und STAT5b (Davey et al., 1999). Daraus ergibt sich eine negative Rückkopplung von Socs3 auf seine eigene Genexpression (Auernhammer et al., 1999). Neben der Inhibition der jeweiligen Zytokineffekte reguliert Socs3 die Apoptose von Endothelzellen (Jiang et al., 2012) und fungiert als Inhibitor einer pathologischen Angiogenese (Stahl et al., 2012).

#### 1.4.4 Der Notch-Signaltransduktionsweg

Das Gen für den Notch-Rezeptor wurde zuerst in der Fruchtfliege entdeckt, deren Flügelenden bei teilweisem Funktionsverlust dieses Gens eingekerbt (engl. „*notch*“ = Kerbe) waren (Mohr, 1919).

Es hat über laterale und induktive Inhibition Einfluss auf die Differenzierung und das Schicksal von Zellen (Artavanis-Tsakonas et al., 1995).

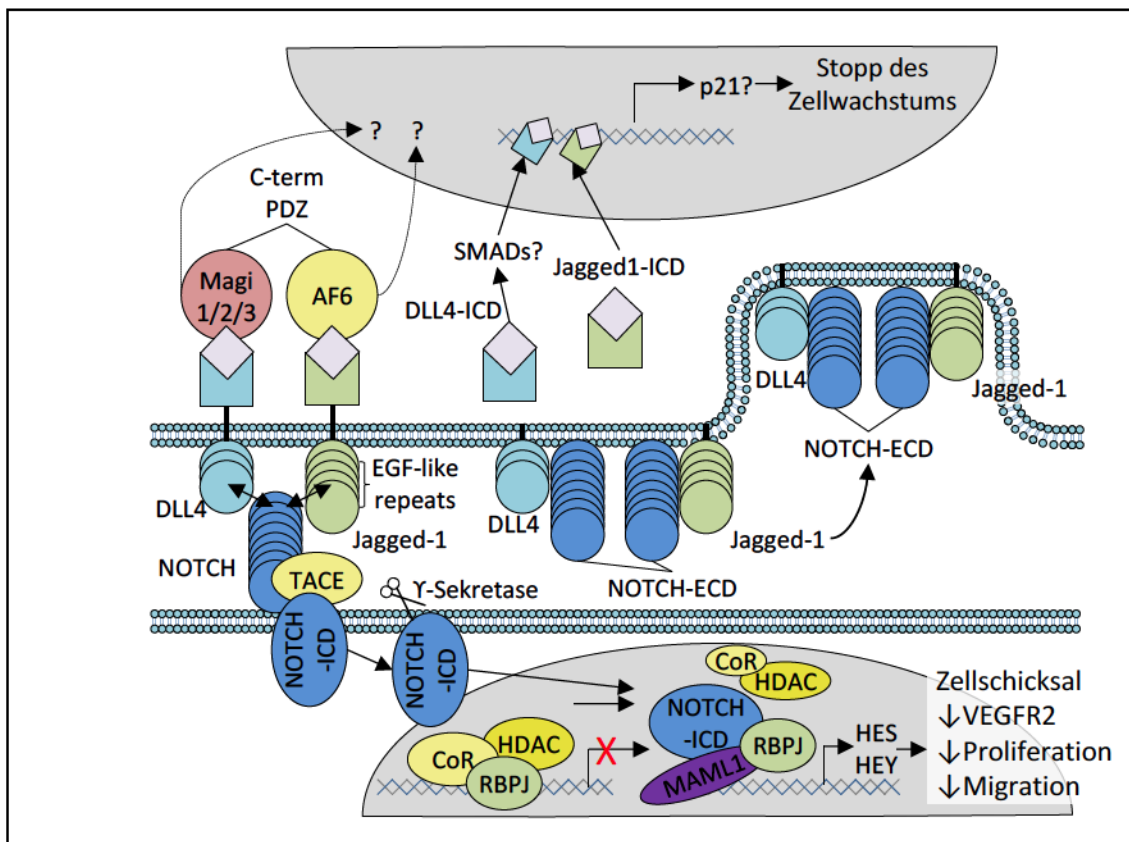
In Säugetieren existieren vier verschiedene Notch-Gene: Notch1-4 (Ellisen et al., 1991; Weinmaster et al., 1992; Lardelli et al., 1994; Uyttendaele et al., 1996).

Die Notch-Genprodukte sind Transmembran-Proteine, die einander im Aufbau ähneln. Sie werden als Vorläuferproteine synthetisiert und werden im trans-Golgi-Netzwerk durch eine Furin-ähnliche Konvertase proteolytisch in eine extrazelluläre und eine transmembrane Domäne, die aus einem kleinen extrazellulären Anteil, einem Transmembrananteil und dem intrazellulären Teil besteht, gespalten (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Die beiden Domänen bilden über eine nicht-kovalente Bindung einen heterodimeren Rezeptor an der Zelloberfläche (Rand et al., 2000).

Die extrazelluläre Domäne der Proteine besteht vor allem aus sich wiederholenden EGF (engl. „*Epidermal growth factor*“)-ähnlichen Sequenzen. Hiervon enthalten Notch1 und Notch2 jeweils 36, Notch3 34 und Notch4 29. Neben diesen Sequenzen gibt es in allen Notch-Proteinen noch drei LNR (Lin-12/Notch-repeats). Die intrazelluläre Domäne enthält jeweils sechs cdc10/Ankyrin-repeats und am C-Terminus einen PEST (Prolin, Glutamat, Serin und Threonin)-reichen Abschnitt (Ellisen et al., 1991; Weinmaster et al., 1992; Lardelli et al., 1994; Uyttendaele et al., 1996).

Es existieren fünf Notch-Liganden: jagged-1 (Lindsell et al., 1995), jagged-2 (Luo et al., 1997), delta-like-1 (dll-1) (Bettenhausen et al., 1995), dll-3 (Dunwoodie et al., 1997) und dll-4 (Shutter et al., 2000). Nach der Ligandenbindung an den Notch-Rezeptor erfolgen zwei proteolytische Spaltungen des Rezeptors. Die erste erfolgt an der extrazellulären Domäne durch die Metalloprotease TACE (engl. „*TNF- $\alpha$  converting enzyme*“) aus der ADAM (engl. „*A Disintegrin And Metalloproteinase*“-Familie (Brou et al., 2000; Mumm et al., 2000). Durch diese erste proteolytische Spaltung wird eine zweite durch eine Presenilin-1-abhängige  $\gamma$ -Secretase an der Transmembrandomäne ermöglicht. Durch diese wird die NICD (engl. „*Notch intracellular domain*“) freigesetzt

(Strooper et al., 1999). Dieses wandert in den Nucleus und interagiert dort mit dem Transkriptionsfaktor RBPJk (engl. „*Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J*“) (Tamura et al., 1995; Beatus et al., 1999; Kato et al., 1996). Durch diesen wird die Transkription von Zielgenen induziert. Zum einen wird die Expression von Mitgliedern der Hairy and enhancer of split (HES)-Gene (z.B. HES-1 (Jarriault et al., 1995), HES-5 (La Pompa et al., 1997; Handler et al., 2000), zum anderen die Expression der HEY (engl. „*Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif*“)-Gene (Maier und Gessler, 2000; Nakagawa et al., 2000) beeinflusst (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Übersicht über den Notch-Notch-Ligand- Signalweg in Endothelzellen (modifiziert nach Holderfield und Hughes, 2008).

Weiterhin wird auch die Genexpression von NF-κB (engl. „*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*“) (Oswald et al., 1998), CD21 (engl. „*cluster of differentiation 21*“) (Strobl et al., 2000), der PPAR (engl. „*peroxisome proliferator-activated receptor*“)-Familie (Garcés et al., 1997; Nickoloff et al., 2002) und des Zellzyklusregulators p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Rangarajan et al., 2001) beeinflusst. Durch die Stimulation der HES-1-Expression wird nachfolgend die Expression der

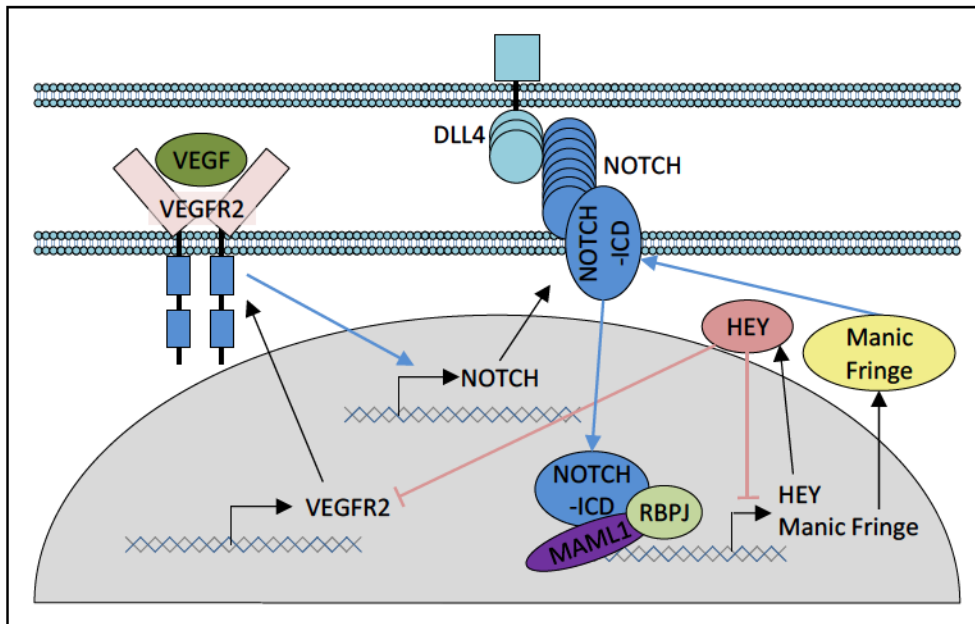
Differenzierungsfaktors MyoD reduziert und dadurch die Myogenese inhibiert (Kuroda et al., 1999). Einen weiteren Effekt hat Notch auch auf die Angiogenese.

Es konnte gezeigt werden, dass Notch-1 (Reaume et al., 1992), Notch-4 (Uyttendaele et al., 1996) und dll-4 (Shutter et al., 2000) in Endothelzellen exprimiert werden. Mäuseembryonen mit einem homozygoten Defekt für Notch-1 zeigen Defekte in der Angiogenese, die aber nicht so schwer sind wie bei Embryonen mit homozygoten Knockout sowohl für Notch-1 als auch Notch-4. Die betroffenen Embryonen zeigen vor allem ein Unvermögen, aus dem bereits in der Vaskulogenese angelegtem Gefäßnetz größere Gefäße im Sinne der Angiogenese zu bilden (Krebs et al., 2000). Während homozygote Notch-4 defiziente Embryonen sich vollkommen normal entwickeln (Krebs et al., 2000) versterben homozygote Notch-1 defiziente Embryonen bereits 9,5 Tage post coitum (Swiatek et al., 1994; Conlon et al., 1995). Notch-3 hingegen wird nicht in den Endothelzellen, sondern in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (Joutel et al., 2000). Mutationen des Notch-3-Gens sind mit der zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (CADASIL) assoziiert (Joutel et al., 1996).

#### **1.4.5 Zusammenhang der untersuchten Angiogenese-Faktoren**

Es wurden Hinweise dafür gefunden, dass die Notch-Familie und die VEGF-Familie in einer funktionellen Verbindung miteinander stehen. So induziert VEGF-A über VEGFR-1, VEGFR-2 und die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) die Expression von Notch-1 und dll-4 in arteriellen Gefäßen (Liu et al., 2003; Lobov et al., 2007). Dll-4 aktiviert seinerseits Notch-1 und Notch-4 (Shutter et al., 2000; Shawber et al., 2003) und wird auch durch Hypoxie vermehrt exprimiert (Mailhos et al., 2001; Diez et al., 2007). Wird dll-4 verstärkt exprimiert, sinkt die Expression von VEGFR-2 und Neuropilin 1 und dadurch auch die Effekte von VEGF-A auf Endothelzellen (Williams et al., 2006) ([Abbildung 3](#)).





**Abbildung 3:** Übersicht über die Interaktionen zwischen dli-4/ Notch und VEGF/VEGFR-2 (modifiziert nach Holderfield und Hughes, 2008).

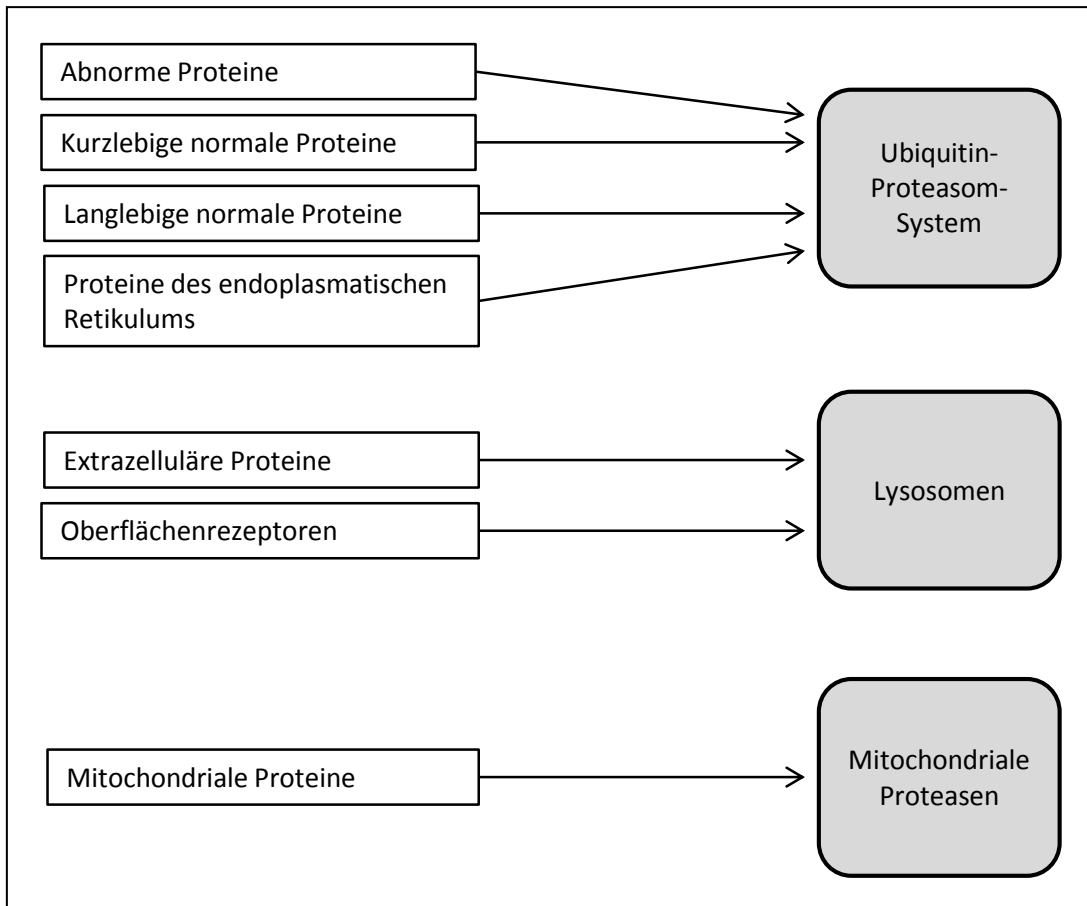
In einer Studie zum Glioblastoma multiforme konnte gezeigt werden, dass Hypoxie die Socs3-Expression vermindert. Dadurch erhöht sich die Expression von STAT3, das seinerseits an das HRE des VEGF-Promotors bindet und dadurch eine Hochregulierung des VEGF-Gens induziert (Yokogami et al., 2013). Eine weitere Untersuchung mit neuronalen Stammzellen zeigte, dass nach einer Überexpression von Socs3 die mRNA-Level von Notch-1 und HES-5 einen Tag nach der Überexpression signifikant hochreguliert waren und drei Tage nach der Überexpression das Level von Notch-1 noch immer hochreguliert und das von HES-5 signifikant herunterreguliert war (Cao et al., 2006). Notch-1 ist seinerseits an der Hochregulierung von Socs3 in mit *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin infizierten Makrophagen beteiligt (Narayana und Balaji, 2008).

## 1.5 Atrophie

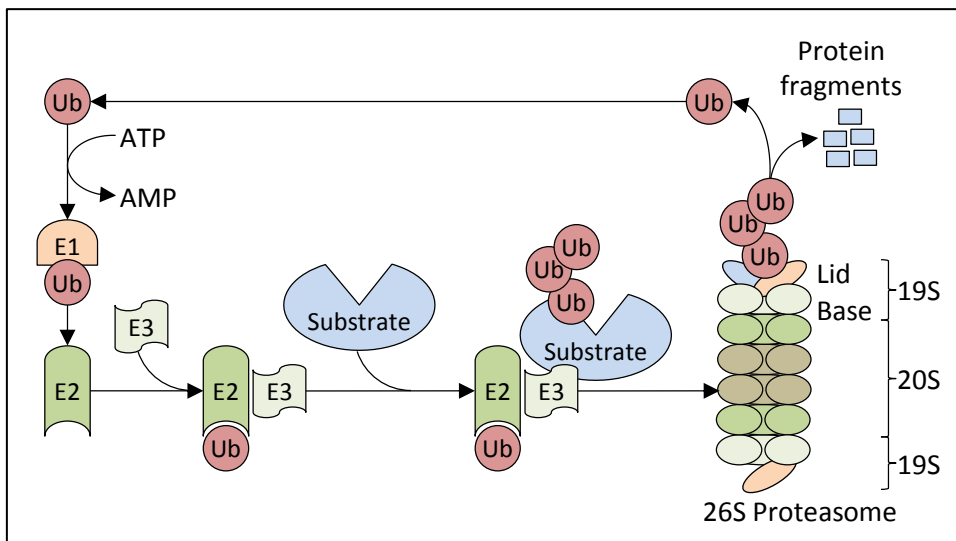
### 1.5.1 Allgemeines

Atrophie ist definiert als die Größenabnahme eines Gewebes oder eines Organs durch Zellschrumpfung. Diese ist durch einen Verlust an Zellorganellen, Zytoplasma und Proteinen bedingt (Bonaldo und Sandri, 2013). In der Muskulatur zeigt sie sich in einer insgesamt geringeren Muskelmasse und einer verminderten Querschnittsfläche der

einzelnen Muskelfasern (Nicks et al., 1989). Verschiedene Bedingungen können zu Muskelatrophie führen. So können zum Beispiel Glukokortikoidtherapien (Czerwinski et al., 1989), Fasten (Wing und Goldberg, 1993), Immobilisierung oder Denervierung eines Muskels (Bodine et al., 2001a) und Folgen von Krankheiten, wie zum Beispiel Tumorkachexie, Sepsis (Reed et al., 2012) oder Diabetes mellitus (Price et al., 1996) zu einer Degradation von Muskelproteinen und Muskelatrophie führen. Bei Muskelatrophieprozessen werden zwei spezifische Gene verstärkt exprimiert: MuRF1 (engl. „*muscle ring finger 1*“) und MAFbx (engl. „*muscle atrophy F-box*“). Diese kodieren für Ubiquitin-E3-Ligasen (Bodine et al., 2001a). Es gibt verschiedene Wege in der Zelle, Proteine abzubauen ([Abbildung 4](#)). Der größte Anteil der Proteolyse im Zytosol geschieht über das Ubiquitin-Proteasom-System ([Abbildung 5](#)). Das Polypeptid Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 8,5 kDa (Ciechanover et al., 1980). Damit Ubiquitin an sein Substrat binden kann sind drei enzymatisch regulierte Schritte notwendig. Die entsprechenden Enzyme sind das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) (Ciechanover et al., 1981), das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) (Hershko et al., 1983) und die Ubiquitin-Ligase (E3) (Hershko et al., 1983). Das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) aktiviert den C-Terminus des Ubiquitin-Proteins, indem es ATP-abhängig mit einem Cystein-Rest mit der c-terminalen Carboxygruppe des Ubiquitin eine Thioesterbindung bildet (Hershko et al., 1981; Haas et al., 1982). Danach wird das Ubiquitin von dem E1-Cystein auf ein Cystein des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) transferiert (Haas und Rose, 1982; Pickart und Eddins, 2004). Der dritte und letzte Schritt erfolgt durch die sogenannten Ubiquitin-Ligasen (E3). Zu diesen gehören die Gruppe der RING (engl. „*really interesting new gene*“)-, der HECT (engl. „*homology to E6AP C terminus*“)- und der RBR (engl. „*RING-between-Ring*“)-Familien. Diese übertragen generell das Ubiquitin auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins des Substrats (Hershko et al., 1983; Metzger et al., 2012). Nachfolgend können weitere Ubiquitine auf das bereits Substrat-gebundene Ubiquitin übertragen werden. Die Ubiquitine der Polyubiquitin-Ketten sind über Lysinreste in Position 48 miteinander verknüpft. Es sind mindestens vier aneinandergeschaltete Ubiquitine nötig, damit das abzubauen Substrat vom 26S Proteasomen erkannt und degradiert wird (Chau et al., 1989; Hershko und Ciechanover, 1998; Thrower et al., 2000).



**Abbildung 4:** Substrate der verschiedenen Abbauewege von Muskelproteinen (modifiziert nach Lecker et al., 1999).



**Abbildung 5:** Übersicht über das Ubiquitin-Proteasom-System (modifiziert nach Rahimi, 2012).

### 1.5.2 Familie der Muskel-spezifischen RING-Finger-Proteine (MuRF)

Die Familie der Muskel-spezifischen-RING-Finger (MuRF)-Proteine setzt sich aus den Mitgliedern MuRF1, 2 und 3 zusammen, die von unterschiedlichen Genen exprimiert werden (Spencer et al., 2000; Centner et al., 2001). In ihrem Aufbau ähneln sie sich sehr stark. MuRF2 und MuRF3 sind zu 62 % bzw. 77 % homolog zu MuRF1. Der N-Terminus der drei MuRFs ist sogar zu 82 % bis 85 % homolog. Sie besitzen eine N-terminale RING-Domäne, gefolgt von einem Zink-Finger (B-Box), einer MuRF family-specific conserved box und zwei coiled-coil-Domänen. Der C-Terminus hingegen ist unterschiedlicher gestaltet, zeichnet sich aber dennoch gemeinschaftlich durch einen hohen Gehalt an Glutamat und Aspartat aus (Centner et al., 2001). Während MuRF1 und MuRF3 spezifisch in der quergestreiften Muskulatur vorkommen, existiert MuRF2 neben der Muskulatur ferner auch in der Leber (Spencer et al., 2000; Centner et al., 2001).

Die Ubiquitin-E3-Ligase MuRF-1 (auch „*striated muscle RING zinc finger protein (SMRZ)*“ oder „*TRIM63*“ genannt) besitzt eine cDNA-Länge von 1,9 kb und kodiert für ein 38 kDa großes RING-Finger-Protein aus 288 Aminosäuren (Centner et al., 2001; Dai und Liew, 2001). Im Muskel ist es in der Peripherie der M- und der Z-Linie lokalisiert und bindet an Titin (Centner et al., 2001). MuRF1 ist ein wichtiger Mediator von Atrophievorgängen im Muskel. Es wird vor allem in Typ II-Muskelfasern exprimiert (Moriscot et al., 2010).

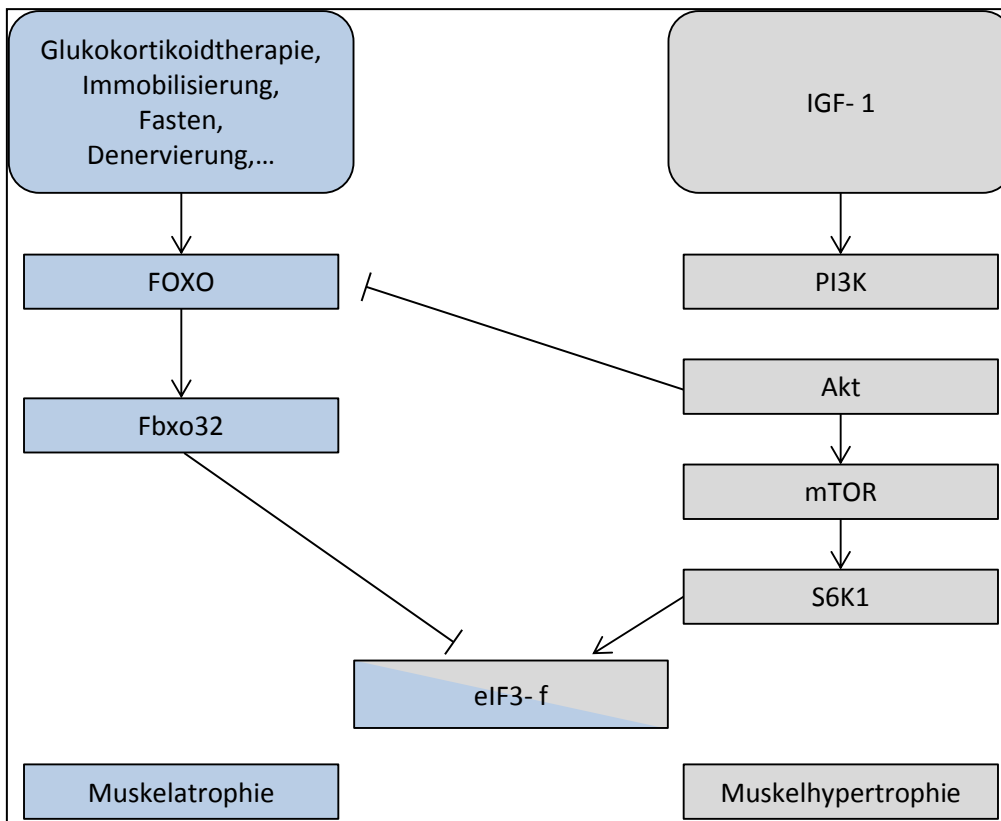
Es konnte gezeigt werden, dass im Rahmen von Muskeldenernervierung die Genexpression von MuRF1 signifikant erhöht war. Im Gegensatz dazu ist der Muskelverlust von MuRF1-Knockout-Tieren unter diesen Bedingungen im Vergleich zu den MuRF1-kompetenten Tieren deutlich verringert (Bodine et al., 2001a). Eine weitere Studie verdeutlicht, dass sich sowohl die Querschnittsfläche des M. soleus als auch die der einzelnen Muskelfasern bei Ruhigstellung dieses Muskels signifikant verringern, dieser Effekt jedoch bei MuRF1-Knockout-Tieren nicht oder nur leicht ausgeprägt ist (Labeit et al., 2010). Der M. tibialis anterior (welcher beinahe ausschließlich aus Typ II-Fasern besteht) war durch den Knockout von MuRF1 im Gegensatz zum M. soleus (welcher aus Fasern vom Typ I und II besteht) nach Denervierung deutlich stärker vor Atrophie geschützt (Moriscot et al., 2010).

Im Rahmen seiner Funktion als Ubiquitin-Ligase konnte *in vitro* gezeigt werden, dass MuRF1 in der Herzmuskulatur Troponin I polyubiquitinyliert und zu dessen Degradierung führt (Kedar et al., 2004). In der Skelettmuskulatur sind die schwere Ketten des Myosins (Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007), die leichten Myosin-Ketten 1 und 2, das Myosin-bindende Protein C (Cohen et al., 2009) und das Aktin (Polge et al., 2011) Substrate von MuRF1.

### 1.5.3 Fbxo32

Fbxo32 (engl. „*F-box only protein 32*“), auch „Muscle Atrophy F-box (MAFbx)“ oder „Atrogin-1“ genannt, kommt spezifisch in der Skelett- und Herzmuskulatur vor. Es besitzt eine F-Box-Domäne und gehört zum sogenannten SCF (engl. „*Skp, Cullin, F-box protein*“)-Ubiquitin-Ligase-Komplex, welcher eine E3-Ubiquitin-Ligase darstellt. Der SCF-Komplex besteht aus einem F-Box-Protein, dem Skp-1 (engl. „*S-phase kinase-associated protein1*“), dem Rbx1 (engl. „*RING-box protein 1*“) und dem Cullin-1. Wie auch für MuRF1 konnte für Fbxo32 in der Skelettmuskulatur ein signifikanter Anstieg der Genexpression unter Muskelatrophie-auslösenden Bedingungen nachgewiesen werden (Gomes et al., 2001; Bodine et al., 2001a).

Eine verstärkte Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR (engl. „*Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin*“)-Signalwegs durch z.B. Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) führt hingegen zu Muskelhypertrophie und kann bei Denervierung eines Muskels Atrophievorgängen entgegenwirken (Bodine et al., 2001b). Akt phosphoryliert Forkhead-Box-Proteine der Subklasse O (FOXO) und hemmt dadurch die FOXO-abhängige Transkription und fördert den Transport der FOXO-Proteine aus dem Nukleus in das Zytoplasma (Brunet et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass IGF-1 über den PI3K/Akt-Signalweg die FOXO-Transkriptionsfaktoren hemmt und dadurch die Expression von Fbxo32 vermindert. Das dephosphorylierte Forkhead-Box-Protein 3 (FOXO3) aktiviert den Promotor des Fbxo32-Gens und steigert somit die Expression von Fbxo32 (Sandri et al., 2004) ([Abbildung 6](#)).



**Abbildung 6:** Übersicht über die an der Fbxo32 vermittelten Muskelatrophie beteiligten Faktoren (modifiziert nach Lagirand-Cantaloube et al., 2008).

Fbxo32-Knockout-Mäuse sind gegenüber Wildtyp-Tieren vor Muskelatrophie geschützt (Bodine et al., 2001a). Die F-Box-Protein-Domäne vermittelt die Bindung an das zu degradierende Substrat (Skowyra et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Fbxo32 in der Herzmuskulatur direkt mit dem Calcineurin A- $\alpha$ -Aktinin-2-Komplex interagiert, das Calcineurin A polyubiquitinyliert und bei Überexpression eine Hypertrophie der Kardiomyozyten verhindert (Li et al., 2004). Außerdem interagiert es mit MyoD (Tintignac et al., 2005; Lagirand-Cantaloube et al., 2009), das wichtig für die Regeneration der Muskulatur ist (Cooper et al., 1999). Eine Überexpression von Fbxo32 führt zu einer verstärkten Degradation von MyoD (Tintignac et al., 2005; Lagirand-Cantaloube et al., 2009). Ein weiteres Ziel von Fbxo32 ist eIF3-f (engl. „*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F*“), der durch Fbxo32 polyubiquitiniert und so degradiert (Lagirand-Cantaloube et al., 2008) und dadurch die Aktivierung von S6K1 (engl. „*ribosomal protein S6 kinase 1*“) durch mTOR supprimiert wird (Csibi et al., 2010). Wird die Expression von eIF3 unterdrückt, atrophieren die Myotuben. Wird eIF3-f überexprimiert, hypertrophieren die Myotuben und die Skelettmuskulatur von Mäusen. Es zeigt sich ein signifikant größerer Durchmesser der Myotuben, eine

größeren Anzahl an Myonuklei und Muskelproteinen (Lagrand-Cantaloube et al., 2008). eIF3-f seinerseits wird über den mTor/S6K1 (ribosomal S6 kinase)–Signalweg, welcher unter anderem durch IGF-1 aktiviert wird, stimuliert (Holz et al., 2005) ([Abbildung 6](#)).

## 1.6 Apoptose

### 1.6.1 Allgemeines

Apoptose ist der Prozess des programmierten Zelltodes. Er zeichnet sich durch besondere Merkmale wie Zellschrumpfung, Kondensation des Zellkerns, DNA-Fragmentierung, Fragmentierung in membran-gebundene Apoptosekörperchen und deren Phagozytose durch benachbarte Zellen aus (Kerr et al., 1972; Nagata, 2000). Apoptose tritt in der Skelettmuskulatur sowohl während der normalen Entwicklung wie auch bei Schädigung auf (Sandri und Carraro, 1999). Allgemein kann die Apoptose über zwei verschiedene Signalkaskaden ablaufen: dem intrinsischen und dem extrinsischen Signalweg (Fulda und Debatin, 2006).

### 1.6.2 Signalwege während der Apoptose

#### 1.6.2.1 Intrinsischer Signalweg

Der intrinsische Signalweg, auch Bcl-2 (engl. „*B-cell lymphoma 2*“)-regulierter oder mitochondrialer Signalweg genannt, wird vor allem durch Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert ([vgl. 1.6.3](#)). Eine gute Übersicht über die Bcl-2-Proteinfamilie gibt ein Review aus dem Jahre 2014 (Czabotar et al., 2014). Durch Stressoren wie z.B. ATP-Mangel ändern die Bcl-2-Familienmitglieder Bax (engl. „*Bcl-2 associated X protein*“) und Bak (engl. „*Bcl-2-antagonist/killer-1*“) ihre Struktur in Homo-Oligomere, die miteinander assoziiert sind (Mikhailov et al., 2003). In Folge der Oligomerisierung wird Cytochrom C von den Mitochondrien freigesetzt (Degenhardt et al., 2002; Mikhailov et al., 2003). Die Oligomerisierung von Bax wird durch Bcl-2 geblockt (Mikhailov et al., 2001; Antonsson et al., 2001; Mikhailov et al., 2003). Das aus den Mitochondrien freigesetzte Cytochrom C fördert in Gegenwart von ATP oder dATP die Oligomerisierung des Proteins Apaf-1 (engl. „*Apoptotic protease activating factor 1*“)

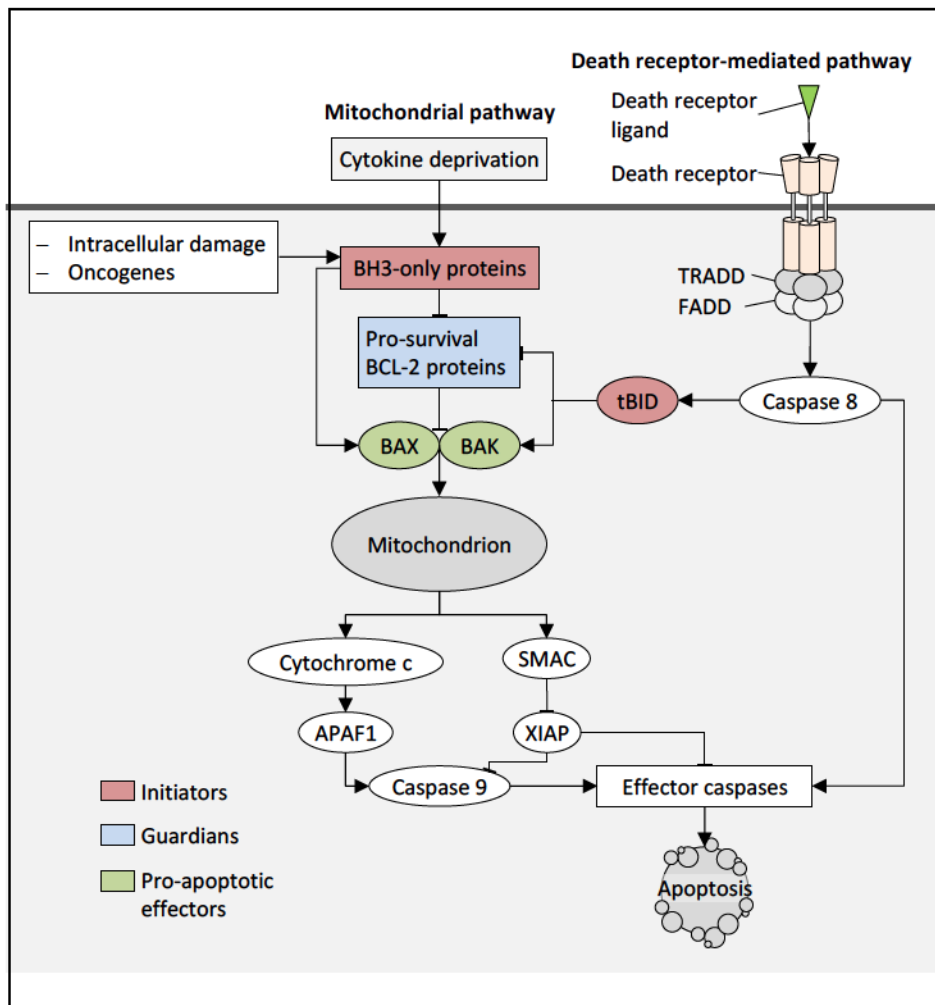
und es bildet sich ein Apaf-1/Cytochrom C-Komplex (sog. Apoptosom) (Zou et al., 1997; Zou et al., 1999). Anschließend wird die Procaspase 9 an den Komplex rekrutiert und durch Auto-Katalyse aktiviert. Die aktivierte Caspase 9 wird dann vom Komplex freigesetzt (Zou et al., 1999; Li et al., 1997) und aktiviert im folgenden Schritt die Effektor-Caspase 3 (Li et al., 1997; Srinivasula et al., 1998).

Nach Apoptoseinduktion wird neben Cytochrom C auch Smac (engl. „*second mitochondria-derived activator of caspases*“), ein mitochondriales Protein, aus den Mitochondrien freigesetzt, welches die inhibitorische Wirkung der IAPs (engl. „inhibitors of apoptosis proteins“) neutralisiert (Du et al., 2000) ([Abbildung 7](#)).

#### **1.6.2.2 Extrinsischer Signalweg**

Der extrinsische Signalweg der Apoptose wird durch Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren, welche zur Familie der TNF-Superfamilien-Rezeptoren gehören, aktiviert. Zu diesen Liganden gehört beispielsweise auch TNF. Die Ligandenbindung führt zur Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und diese ihrerseits zur Aktivierung von Effektor-Caspasen (Czabotar et al., 2014; Mcllwain et al., 2013) ([Abbildung 7](#)).





**Abbildung 7:** Übersicht über den intrinsischen und extrinsischen Signalweg der Apoptose (modifiziert nach Czabotar et al., 2014).

### 1.6.3 Bcl-2 (B-cell lymphoma 2)-Familie

Bcl-2 wurde als erstes Mitglied der Bcl-2-Familie entdeckt (Tsujimoto et al., 1984). Die Homologie der Bcl-2-Familienmitgliedern ist am größten innerhalb der vier sogenannten „Bcl-2 homology regions“ (BH1-4) ausgeprägt (Oltvai et al., 1993; Zha et al., 1996; Chittenden et al., 1995a). Die Bcl-2-Familie lässt sich in drei Untergruppen aufteilen: in die pro-apoptotischen, die anti-apoptotischen und die sog. BH3 (Bcl-2 homology 3)-only Proteine. Pro-apoptotische Familienmitglieder sind z.B. Bax (Oltvai et al., 1993) und Bak (Chittenden et al., 1995b), anti-apoptotische beispielsweise Bcl-2 (Sentman et al., 1991) und Bcl-x<sub>L</sub> (Boise et al., 1993). Zu den BH3-only-Proteinen gehören unter anderem Bim (engl. „Bcl-2-interacting mediator of cell death“) (O'Connor et al., 1998), Bik (engl. „Bcl-2-interacting killer“) (Boyd et al., 1995) und Bid (engl. „BH3 interacting-domain-death agonist“) (Wang et al., 1996), deren einzige

Homologie zu den weiteren Bcl-2-Familienmitgliedern die konservierte BH3-Domäne ist.

Bcl-2 ist ein 26 kDa großes Protein (Nakai et al., 1993), welches vor allem im Endoplasmatischen Retikulum, in Mitochondrien und der Kernmembran lokalisiert ist (Nakai et al., 1993; Hoetelmans et al., 2000; Gotow et al., 2000; Akao et al., 1994).

Bax ist ein 21 kDa (Oltvai et al., 1993) großes Protein, das vor allem im Cytosol von Zellen vorliegt (Hsu et al., 1997; Wolter et al., 1997). Nach Apoptoseinduktion kommt es jedoch zu einem Shift der Lokalisation des löslichen Bax in eine mitochondrienmembran-gebundene Form (Hsu et al., 1997; Wolter et al., 1997).

#### **1.6.4 Caspase-3**

Die Familie der Caspasen (engl. „*cysteinyI-aspartate specific protease*“) besteht aus mehreren Cysteinproteasen, die ihr Zielprotein nach einem Aspartat schneiden (Alnemri et al., 1996). Caspasen, die in apoptotischen Vorgängen von Bedeutung sind, werden nach ihrer Funktionsweise in Initiator- (Caspase-8 und 9) und Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7) eingeteilt. Initiator-Caspasen aktivieren Effektor-Caspasen, die ihrerseits Schlüsselproteine zerstören und andere Enzyme aktivieren (McIlwain et al., 2013) ([Abbildung 7](#)).

Caspase-3 ist eine 32 kDa große Protease, die eine entscheidende Rolle in der Apoptose spielt (Fernandes-Alnemri et al., 1994). Caspase-3 existiert als ein inaktives Vorläuferprotein, das proteolytisch in ein 20 kDa und 10 kDa großes aktives Heterodimer gespalten wird (Nicholson et al., 1995). Caspase-3 aktiviert die Caspase activated DNase (CAD), die zur DNA-Fragmentierung führt (Liu et al., 1997). Gleichzeitig inaktiviert sie ICAD (engl. „*inhibitor of caspase-activated DNase*“) und damit auch dessen inhibitorischen Effekt auf CAD (Sakahira et al., 1998). In Myotuben und Myoblasten führen pro-apoptotische Stimuli zu den typischen Markenzeichen der Apoptose: Zell- und Zellkernschrumpfung, Aktivierung der Caspase-3 und DNA-Fragmentation (McArdle et al., 1999). In der Skelettmuskulatur spaltet die Caspase-3 unter katabolen Situationen beispielsweise das Actomyosin in der Skelettmuskulatur und produziert ein charakteristisches 14 kDa großes Aktinfragment und weitere Proteine, die anschließend durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert werden

(Du et al., 2004). Weiterhin müssen während kataboler Zustände zur Muskelproteolyse sowohl das Ubiquitin-Proteasom-System wie auch die Apoptose reguliert ablaufen. Es konnte gezeigt werden, dass in einer solchen Situation die PI3K-Aktivität ([vgl. 1.5](#)) reduziert ist, was mit einer gesteigerten Bax- und Caspase-3-Aktivität assoziiert war (Lee et al., 2004).

## 1.7 Entzündung

### 1.7.1 Allgemeines

Inflammation ist eine Reaktion des Körpers auf schädliche Reize und Bedingungen, wie z.B. Infektionen und Gewebsverletzungen (Medzhitov, 2008).

Diese Reaktion führt zu den typischen sichtbaren Zeichen der Entzündung, die bereits von Celsus ca. 40 n. Chr. als Rötung (lat. „*Rubor*“), Überwärmung (lat. „*Calor*“), Schmerz (lat. „*Dolor*“) und Schwellung (lat. „*Tumor*“) charakterisiert wurden (Nathan, 2002). Es kommt zu einem Gewebe zerstörenden Prozess, bei dem Plasmaproteine, Flüssigkeit und Leukozyten aus dem Blut in das zerstörte Gewebe rekrutiert werden. Diese Zuwanderung wird gefördert durch Änderungen in den lokalen Blutgefäßen, die zu Vasodilatation, erhöhter vaskulärer Permeabilität und verstärktem Blutfluss führen (Ashley et al., 2012). Der inflammatorische Prozess wird über viele verschiedene Cytokine und Zellen gesteuert, von denen einige im Folgenden näher erläutert werden.

### 1.7.2 Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Interleukin 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) gehört zur Familie der Interleukin-1-Zytokine. Es wird hauptsächlich von Monozyten (Arend et al., 1989), Makrophagen (March et al., 1985) und dendritischen Zellen (Gardella et al., 2000) sezerniert. Das humane IL-1 $\beta$ -Protein wird als inaktives Vorläuferprotein (pre-IL-1 $\beta$ ) synthetisiert (Mosley et al., 1987), welches aus 269 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht  $M_r$  von 30,75 kDa besitzt (March et al., 1985). Das pre-IL-1 $\beta$  wird zwischen dem Aspartat an Stelle 116 und dem Alanin an Stelle 117 gespalten. So entsteht das aktive pre-IL-1 $\beta$ , das ein Molekulargewicht  $M_r$  von 17,5 kDa besitzt (Black et al., 1989; Kostura et al., 1989). Diese Spaltung wird durch das IL-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE oder Caspase-1), einer

Cystein-Protease, ausgeführt (Cerretti et al., 1992; Thornberry et al., 1992), das seinerseits durch einen Multi-Enzykomplex, dem sogenannten Inflammasom, aktiviert wird (Martinon et al., 2002). Es gibt zwei Typen von Interleukin-1-Rezeptoren, an denen IL-1 $\beta$  binden kann, den Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 (IL-1R1) (Sims et al., 1989) und Typ 2 (IL-1R2) (McMahan et al., 1991). Allerdings erfolgt die typische Wirkweise von IL-1 $\beta$  ausschließlich über den IL-1R1 (Sims et al., 1993). Während der IL-1R1 vor allem auf T-Zellen, Fibroblasten und in geringerem Maß auf den meisten anderen Zellen exprimiert wird (Dower und Urdal, 1987), existiert IL-1R2 vor allem auf B-Zellen, T-Zellen (McMahan et al., 1991), Neutrophilen (Martin et al., 2013), Monozyten und Makrophagen (Pou et al., 2011). Die Sekretion von IL-1 $\beta$  wird z.B. durch bakterielle Bestandteile wie LPS, bakterielle Toxine wie Staphylokokken-Enterotoxin A, dem pyrogenen Streptokokken-Exotoxin A (Andersson et al., 1992) oder auch durch Uratkristalle bei der Hyperurikämie (Martinon et al., 2006) gesteigert. In der Skelettmuskulatur führen kurzweilige intensive Muskelarbeit (Cannon et al., 1989; Fielding et al., 1993) oder Hypoperfusion (Testa et al., 2000) zu einem Anstieg von IL-1 $\beta$ -Protein oder -mRNA. Hingegen zeigte sich durch ein monatelanges physikalisches Training in der Skelettmuskulatur von herzinsuffizienten Patienten eine Abnahme von IL-1 $\beta$  (Gielen et al., 2003). IL-1 $\beta$  besitzt eine pro-inflammatorische Wirkung. Es stimuliert die Expression der Cyclooxygenase-2 (Huang et al., 1998; O'Banion et al., 1996; Said et al., 2002) ([vgl. 1.7.5](#)), des Interleukin-6 (Tseng et al., 1996; Cahill und Rogers, 2008) ([vgl. 1.7.4](#)) in verschiedenen Zelltypen und die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (Furie und McHugh, 1989; Patton et al., 1995; Oliveira et al., 2008). Ferner steigert es die Sekretion des Corticotropin Releasing Hormons und des Adrenocortikotropen Hormons (Uehara et al., 1987b; Uehara et al., 1987a), wirkt fördernd auf die Akute-Phase-Reaktion und die Entwicklung von Fieber (Zheng et al., 1995; Long et al., 1990). In den Myoblasten stört es die Muskeldifferenzierung durch IGF-1 (Broussard et al., 2004).

### **1.7.3 Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF)**

Der Makrophagen-migrationsinhibierende Faktor (MIF) wurde erstmals in den 1960er Jahren als eines von aktivierten Lymphozyten produziertes Chemokin entdeckt (David, 1966; Bloom und Bennett, 1966). Während das MIF-Gen von Mäusen auf dem

Chromosom 10 lokalisiert ist (Bozza et al., 1995), befindet sich das menschliche MIF-Gen auf dem Chromosom 22q11.2 (Budarf et al., 1997). Das MIF-Protein besteht aus 115 Aminosäuren (Weiser et al., 1989), besitzt ein Molekulargewicht von 12,5 kDa und liegt als Homotrimer vor (Sun et al., 1996b; Sun et al., 1996a). Der genaue Signalweg über den MIF zu seinen Effekten führt ist noch nicht bekannt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass MIF an CD74, einem Typ-II-Transmembranprotein, bindet (Leng et al., 2003) und den MAP (engl. „mitogen-activated protein“-) Kinase-Signalweg aktiviert, indem es zur Phosphorylierung von ERK1/2 (engl. „extracellular signal-regulated kinases“) führt (Mitchell et al., 1999). MIF-Quellen sind vor allem Zellen der Adenohypophyse (Bernhagen et al., 1993; Nishino et al., 1995), Makrophagen (Calandra et al., 1994), T-Zellen (Bacher et al., 1996), Mastzellen (Chen et al., 1998), Eosinophile (Rossi et al., 1998), Endothelzellen (Chesney et al., 1999) und einige anderen Zelltypen (Baugh und Bucala, 2002). Die Sekretion von MIF wird unter anderem durch LPS, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Bernhagen et al., 1993; Calandra et al., 1994) und IL-5 (Rossi et al., 1998) stimuliert. MIF seinerseits aktiviert Makrophagen zur verstärkten TNF- $\alpha$ - und IL-8-Sekretion (Calandra et al., 1994; Donnelly et al., 1997) und reguliert die Expression der Matrix-Metalloproteasen 1 und 3 in synovialen Fibroblasten bei Rheumatoider Arthritis hoch (Onodera et al., 2000). Überraschenderweise induzieren Glukokortikoide in niedriger Konzentration die Sekretion von MIF durch Makrophagen und dieses führt seinerseits zu einer verminderten Hemmung der Bildung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 durch Glukokortikoide (Calandra et al., 1995). Daneben führt MIF zu einer verstärkten Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, der Freisetzung von Arachidonsäure, von COX-2 (Sampey et al., 2001; Mitchell et al., 1999; Mitchell et al., 2002) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (Leng et al., 2003) und hält durch Hemmung der p53-induzierten Apoptose eine bereits begonnene Entzündungsreaktion aufrecht (Mitchell et al., 2002). In MIF-defizienten Mäusen konnte nach LPS-Stimulation ein signifikant reduziertes „Rolling“, Adhäsion und Migration von Leukozyten gegenüber den Wildtypen nachgewiesen (Gregory et al., 2004) und ferner gezeigt werden, dass MIF die Fähigkeit von Endothelzellen mit Leukozyten zu interagieren fördert (Cheng et al., 2010). Einen weiteren Effekt auf Endothelzellen übt MIF aus, indem es die Expression der Angiogenese fördernden Faktoren VEGF und IL-8 steigert (Ren et al., 2004; Kim et al., 2007; Bondza et al., 2008). Außerdem wurde in Skelettmuskelproben von Patienten

mit Polymyositis eine erhöhte Expression von MIF gefunden und zwar wurde das MIF-Protein nicht nur in Entzündungszellen, sondern auch in Muskelfasermembranen nachgewiesen (Reimann et al., 2010). In sich entwickelnden Muskelzellen nahm die MIF-Expression mit zunehmender Reife ab. Es wurde vermutet, dass MIF nicht nur eine pro-entzündliche Komponente besitzt, sondern auch einen die Regeneration geschädigter Muskelzelle fördernden Effekt (Reimann et al., 2010). Allerdings supprimiert mIGF-1 (engl. „*muscle-restricted insulin-like growth factor 1*“) in geschädigter Skelettmuskulatur die Expression von MIF und beschleunigt die Regeneration der Muskulatur (Pelosi et al., 2007).

Auch körperliche Anstrengung scheint einen Einfluss auf die zirkulierende MIF-Konzentration zu haben. So wurden 150 Cytokine im Serum von Athleten nach kurzem intensivem Training untersucht: aber nur die Konzentration des zirkulierenden MIF war signifikant vermindert (Schmidt et al., 2009). Ferner wird der Glukose-Metabolismus des Muskels durch MIF reguliert: so stimuliert es die Glykolyse und steigert die Synthese von Fructose-2,6-bisphosphat in Muskelzellen (Benigni et al., 2000).

#### **1.7.4 Interleukin-6 (IL-6)**

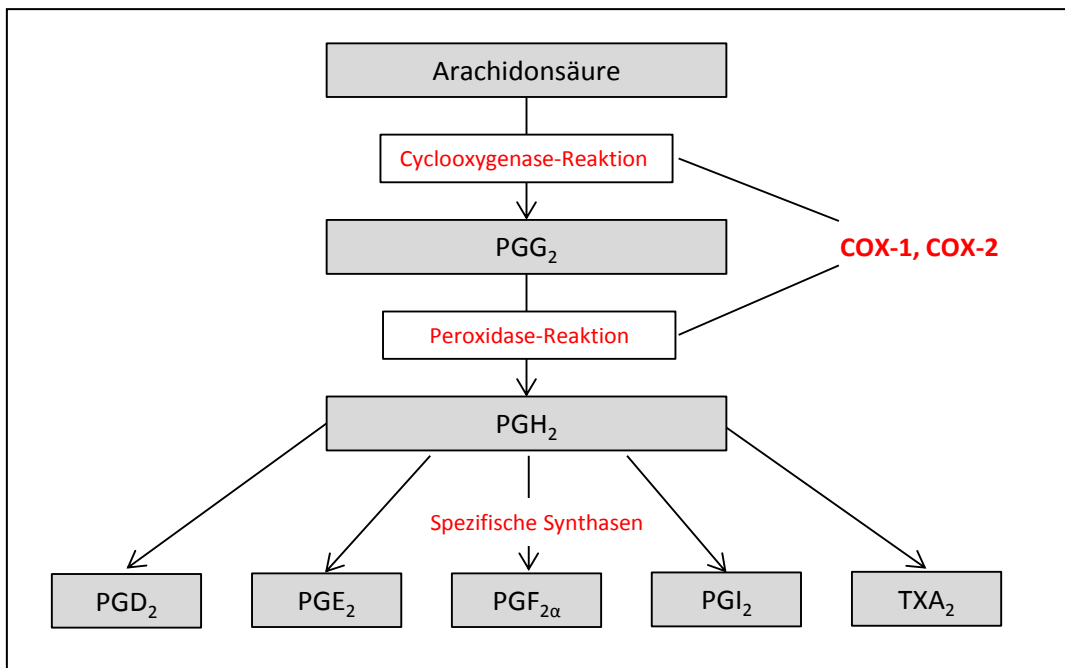
Interleukin-6 (IL-6) wurde als 21 kDa schweres Interleukin entdeckt, das B-Lymphozyten zur Immunglobulin-Sekretion stimuliert (Hirano et al., 1985; Hirano et al., 1986). Es wird von zahlreichen verschiedenen Zelltypen gebildet. In Folge von Hypoxie wird es beispielsweise von Endothelzellen sezerniert (Yan et al., 1995). Auch Fibroblasten (Rossi et al., 2000), Myoblasten (Bartoccioni et al., 1994; Rossi et al., 2000), glatte Muskelzellen (Klouche et al., 1999; Yan et al., 1995), Makrophagen (Busam et al., 1990; Li et al., 2009) und T-Zellen (Hirano et al., 1988) produzieren IL-6. Dieses bindet an den membranständigen IL-6-Rezeptor (IL-6-R) (Yamasaki et al., 1988) oder den löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6-R) (Novick et al., 1989; Müllberg et al., 1993; Lust et al., 1992). Der IL-6-Rezeptor ist mit dem Glykoprotein gp130 assoziiert, das die weitere Signaltransduktion vermittelt (Taga et al., 1989; Hibi et al., 1990). Es kommt zur Aktivierung von JAK/TYK-Kinasen (Stahl et al., 1994) und im weiteren Verlauf des Transkriptionsfaktors STAT3 (Zhong et al., 1994). Weiterhin kann die Signaltransduktion über den MAP-Kinase-Weg ablaufen (Ogata et al., 1997). Die IL-6-

Produktion wird beispielsweise durch LPS (Busam et al., 1990), IL-1 (Cahill und Rogers, 2008; Zhang et al., 1990), TNF (Zhang et al., 1990) oder Cardiotoxin (Zhang et al., 2013) induziert. IL-6 hat sowohl pro- wie auch antiinflammatorische Effekte. Durch das IL-6-System wird beispielsweise während einer inflammatorischen Reaktion die Einwanderung von Leukozyten in das betroffene Gebiet verstärkt (Romano et al., 1997; McLoughlin et al., 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass IL-6 die ICAM-1 (engl. „*intercellular adhesion molecule 1*“-abhängige Lymphozyteneinwanderung im Rahmen einer akuten febrilen Reaktion reguliert (Chen et al., 2006) und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen fördert (Chomarat et al., 2000). Ferner induziert IL-6 die Transkription des C-reaktiven Protein-Gens in Hepatozyten (Ganter et al., 1989). Es wirkt allerdings auch antiinflammatorisch: so inhibiert es beispielsweise die Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF (Schindler et al., 1990) und induziert die Bildung von IL-10-produzierenden Tr1 (engl. „*type 1 regulatory T*“-Zellen (Jin et al., 2013). Weiterhin ist IL-6 ein sogenanntes Myokin. Dies bedeutet, es ist ein Zytokin, das in der Skelettmuskulatur produziert und freigesetzt wird und Effekte auch auf andere Organen ausübt (Pedersen et al., 2003). IL-6-mRNA wird während Muskelarbeit verstärkt von der Skelettmuskulatur exprimiert und IL-6 nach Muskelarbeit freigesetzt (Steensberg et al., 2002). Dies geschieht vor allem bei niedrigen Glykogenkonzentrationen in der Skelettmuskulatur (Keller et al., 2001). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass IL-6 für die Hypertrophie der Skelettmuskulatur verantwortlich ist, indem es die Proliferation von Satellitenzellen und die Zunahme von Myonuklei reguliert (Serrano et al., 2008). Weiterhin spielt es eine Rolle in der Regeneration der Muskulatur (Zhang et al., 2013). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass erhöhte Level an IL-6 zu Atrophie der Skelettmuskulatur führen können (Haddad et al., 2005). Es wird die Meinung vertreten, dass moderate IL-6-Level über eine kurze Zeitdauer keine proatrophischen Effekte auslösen, während persistierende und systemische IL-6-Level gegebenenfalls notwendig für die Induktion kataboler Effekte und Muskelschwund, möglicherweise mit Hilfe weiterer Mediatoren, sind (Muñoz-Cánoves et al., 2013).

### 1.7.5 Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Cyclooxygenasen (COXs) sind bifunktionelle Enzyme, welche die Prostaglandinproduktion aus Arachidonsäure katalysieren. Es existieren drei Formen: Cyclooxygenase-1, -2 und -3, die auch als Prostaglandinsynthasen-1, -2 und -3 bezeichnet werden. Während COX-3 eine Splinevariante des COX-1-Gens darstellt (Chandrasekharan et al., 2002), wird die COX-2 durch ein eigenes Gen kodiert. Die humane COX-2 wird vom PGHS-2-Gen exprimiert, welches auf dem Chromosom 1q25.2-q25.3 lokalisiert ist: es ist 8 Kilobasenpaaren lang und besitzt 10 Exons (Kosaka et al., 1994). Das Enzym COX-2 hat ein Molekulargewicht von circa 70k Da (Hla und Neilson, 1992). Sowohl die COX-1 (Picot et al., 1994) wie auch die COX-2 (Dong et al., 2011) sind Homodimere, die in bis zu 61 % ihrer Aminosäuren übereinstimmen (Hla und Neilson, 1992). Jedes Monomer besteht aus drei Domänen, der N-terminalen EGF-Domäne, der Membran-bindenden Domäne und der katalytischen Domäne. Letztere besitzt die für die Funktion der Enzyme benötigte Cyclooxygenase- und Peroxidaseaktivität (Picot et al., 1994; Luong et al., 1996). Der erste Reaktionsschritt in der Synthese der Prostaglandine besteht aus der zweifachen Oxygenierung der Arachidonsäure mit Hilfe der Cyclooxygenaseaktivität der COXs. So entsteht Prostaglandin  $G_2$  ( $PGG_2$ ). Dieses wird in einem zweiten Schritt durch die Peroxidaseaktivität der COXs zu Prostaglandin  $H_2$  ( $PGH_2$ ) reduziert. Daraus werden in weiteren Schritten durch spezifische Synthasen die Prostaglandine  $D_2$ ,  $F_{2\alpha}$ ,  $E_2$ , Prostaglandin  $I_2$  (Prostacyclin) und Thromboxan  $A_2$  ( $TXA_2$ ) gebildet (Smith et al., 2000; van der Donk et al., 2002; Chandrasekharan und Simmons, 2004) ([Abbildung 8](#)). Diese entwickeln im Anschluss ihre Wirkungen über Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren oder über PPARs (Funk, 2001; Hata und Breyer, 2004).





**Abbildung 8:** Übersicht der Prostaglandinproduktion durch COX-1 und -2 (modifiziert nach Hata und Breyer, 2004).

Während lange postuliert wurde, dass COX-1 konstitutiv und COX-2 induzierbar exprimiert werden, und so die COX-2 vor allem unter pathologischen Bedingungen vorherrscht, mehrte sich mittlerweile die Meinung, dass das Expressions- und Verteilungsmuster der beiden Enzyme weit komplexer ist als bisher gedacht (Zidar et al., 2009; Smith et al., 1996). So konnte in Autopsieproben von 20 Unfallopfern und 48 Operationsbiopsien gezeigt werden, dass COX-1 ziemlich konstant, besonders in Blutgefäßen, interstitiellen Zellen, glatten Muskelzellen, Thrombozyten und mesotheliale Zellen exprimiert wird. COX-2 hingegen findet sich mit höherer Expressionsvariation vor allem in Parenchymzellen vieler Gewebe (Zidar et al., 2009). Ferner konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass COX-2 beispielshalber in den Nieren (Kömhoff et al., 1997), den weiblichen Fortpflanzungsorganen (Stavreus-Evers et al., 2005) und in Trachealzellen (Walenga et al., 1996) konstitutiv vorhanden ist.

Die COX-2-Expression kann jedoch unter pathologischen Bedingungen gesteigert werden. Die Induktion von COX-2-mRNA erfolgt gewöhnlich durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel LPS (Hla und Neilson, 1992; Lee et al., 1992; Jones et al., 1993), TNF und IL-1 (Jones et al., 1993).

In der humanen Skelettmuskulatur variiert die Lokalisation der COX-2 je nach Studie: so wurden z.B. Sarkolemm (Rabuel et al., 2004), mononukleäre Zellen und Blutgefäße (Korotkova et al., 2008) angegeben. In der Skelettmuskulatur von Mäusen konnte gezeigt werden, dass der COX-2-Signalweg für die frühe Phase der Muskelregeneration nach Muskelverletzung (Bondesen et al., 2004), nach Muskelatrophie (Bondesen et al., 2006) und für kompensatorische Muskelhypertrophie (Novak et al., 2009) von Bedeutung ist. Wird Arachidonsäure in vitro zu Skelettmuskelzellen zugegeben, führt dies über einen COX-2-abhängigen Signalweg zu einer Muskelzellhypertrophie (Markworth und Cameron-Smith, 2013). In einer weiteren Studie an Mäusen wird postuliert, dass durch Verletzung der Skelettmuskulatur Makrophagen verstärkt in dieses Gebiet einwandern und dadurch die TGF- $\beta$ 1 (engl. „*transforming growth factor beta 1*“-Expression in der Muskulatur steigern. Durch deren Anstieg wird wiederum die Produktion von Prostaglandinen COX-2-abhängig erhöht. Die beteiligten Komponenten regulieren sich dabei gegenseitig. Diese Mechanismen sind in der inflammatorischen Phase der Muskelregeneration relevant (Shen et al., 2008). Auf der anderen Seite kann durch COX-2-Inhibition mit Hilfe von Meloxicam, einem nichtsteroidalen Antirheumatikum, das LPS-induzierte Ansteigen von Fbxo32 in der Skelettmuskulatur von Ratten verhindert werden (Martin et al., 2012). Ferner wurde in einem Mausmodell zur Untersuchung der Muskeldystrophie Typ Duchenne im interzellulären Raum von Skelettmuskelzellen ein deutlicher Anstieg der COX-2-Expression gefunden (Oliveira et al., 2013).

#### **1.7.6 Tumornekrosefaktor (TNF)**

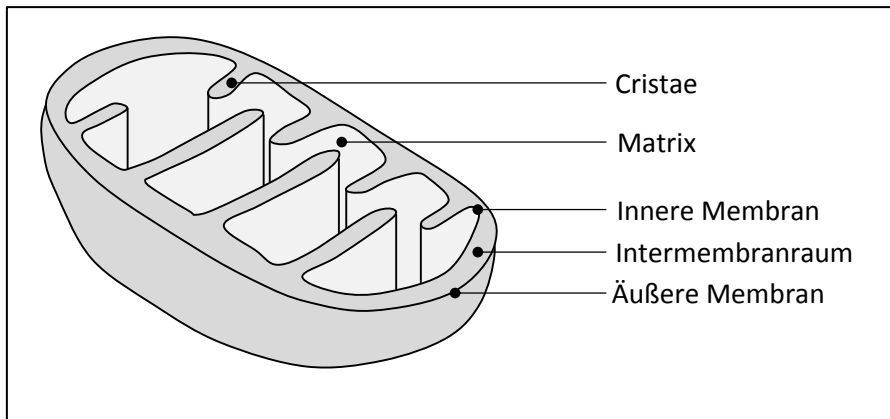
Auch der Tumornekrosefaktor (TNF) spielt eine entscheidende Rolle in Entzündungsreaktionen und der Apoptose. TNF wurde als eine durch Endotoxin induzierbare Substanz, die zu Nekrosen in Tumoren führt, entdeckt (Carswell et al., 1975). TNF wird von vielen verschiedenen Zellen, unter anderem von Keratinozyten (Köck et al., 1990), B- und T-Zellen (Tumanov et al., 2010), Endothelzellen (Imaizumi et al., 2000), Mastzellen (Bradding et al., 1994), Monozyten (Kelker et al., 1985) und Makrophagen (Fehrenbach et al., 2003; Clavel et al., 2008), sezerniert. Pro-TNF ist ein 26 kDa großes Transmembranprotein (Kriegler et al., 1988). Es ist ein Vorläuferprotein, das durch eine membran-gebundene Metalloproteinase, der TACE, bearbeitet wird. So

entsteht das reife lösliche 17 kDa große TNF (Moss et al., 1997; Black et al., 1997). TNF bindet an zwei verschiedene Rezeptoren: TNFR1 (auch p55/p60 genannt) und TNFR2 (auch p75/p80 genannt) (Vandenabeele et al., 1995; Brockhaus et al., 1990; Loetscher et al., 1990). Durch die Rezeptoraktivierung kann zum einen Apoptose ausgelöst werden (Tartaglia et al., 1993; Polunovsky et al., 1994; Wang et al., 2008b) ([vgl. 1.6.2.2](#)). Zum anderen reguliert TNF inflammatorische Prozesse. So werden beispielsweise die COX-2 (Mitchell et al., 1994), IL-1, PGE<sub>2</sub> (Bachwich et al., 1986), IL-8 (Smart und Casale, 1994) und IL-6 (Tseng et al., 2010) durch TNF induziert. Weiterhin fördert TNF die transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten (Smart und Casale, 1994).

In der Skelettmuskulatur führt TNF zu Muskelatrophie (Reid und Li, 2001; Li et al., 2003; Larichaudy et al., 2012) und verstärkter Glykolyse (Remels et al., 2015). Es ist ferner ein Regulator von Myogenese und Muskelregeneration (Chen et al., 2007) und inhibiert die Myoblastendifferenzierung (Meyer et al., 2015).

## 1.8 Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, die zwei Membranen besitzen: die äußere und die innere Membran. Zwischen den beiden Membranen liegt der Intermembranraum. Die innere Membran umgibt die Matrix und ist stark gefaltet. So entstehen die sogenannten Cristae ([Abbildung 9](#)). In der inneren Membran sind die Enzyme der Atmungskette und die ATP-Synthase lokalisiert (McBride et al., 2006). Durch oxidative Phosphorylierung entsteht hier aus ADP und Phosphat ATP (Hüttemann et al., 2007). Ferner nehmen Mitochondrien am Pyruvatstoffwechsel teil. Das cytosolische Pyruvat, das vor allem als Endprodukt der Glykolyse vorkommt, diffundiert in den Intermembranraum der Mitochondrien und wird über den mitochondrialen Pyruvat-Träger (engl. „*mitochondrial pyruvate carrier*“ [MPC]) in die Matrix transportiert, wo es im Citrat-Zyklus weiter verstoffwechselt wird (Herzig et al., 2012; Bricker et al., 2012; Gray et al., 2014). Ein großer Anteil des Pyruvats wird allerdings im Cytosol unabhängig von Mitochondrien zu Laktat reduziert (Gray et al., 2014).



**Abbildung 9:** Übersicht über den Aufbau eines Mitochondriums (modifiziert nach Cooper, 2000).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie z.B. Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder Superoxid-Anion ( $\text{O}_2^-$ ), werden von Mitochondrien als Nebenprodukte innerhalb der Atmungskette gebildet (Chen et al., 2003; Guzy et al., 2005; Quinlan et al., 2013). Angriffsorte der ROS sind beispielsweise die mitochondriale DNA (Esposito et al., 1999), Proteine (Ischiropoulos und Al-Mehdi, 1995) oder Lipide (Domijan et al., 2014), die dadurch geschädigt werden können. Andererseits fungieren ROS als wichtige Regulatoren intrazellulärer Signalwege (Finkel, 2011). Geschädigte Mitochondrien können durch Mitophagie abgebaut werden. Dies bezeichnet einen Prozess, bei dem durch Autophagie selektiv Mitochondrien beseitigt werden (Lemasters, 2005). Hierbei erfolgt die Sequestration der Mitochondrien in Vesikel, die von einer Doppelmembran umgeben sind, den sogenannten Autophagosomen. Diese werden ihrerseits in den Lysosomen abgebaut (Ashrafi und Schwarz, 2013). Mitophagie kann beispielsweise durch oxidativen Stress in Form von ROS induziert werden (Frank et al., 2012; Wang et al., 2012). Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass länglich geformte Mitochondrien gegenüber Mitophagie, ausgelöst durch ROS oder Fasten, resistenter sind (Gomes et al., 2011; Wang et al., 2012; Rambold et al., 2011). In den Mitochondrien sind allerdings auch Enzyme mit antioxidativer Funktion lokalisiert. Zu diesen gehört beispielsweise die Superoxiddismutase 2 (Sod2) (Weisiger und Fridovich, 1973). Diese katalysiert die Umwandlung von  $\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (McCord und Fridovich, 1969). Nach Inaktivierung des Sod2-Gens von Mäusen kam es zur oxidativen Schädigung der DNA und Hemmung von Enzymen der Atmungskette (Melov et al., 1999).

Mitochondrien besitzen ferner eine Rolle in der Induktion der Apoptose über den intrinsischen Signalweg ([vgl. 1.6.2.1](#)).

In der humanen Skelettmuskulatur können drei große Gruppen an Muskelfasertypen unterschieden werden. Diese unterscheiden sich unter anderem in der Mitochondrienanzahl und ihrem Stoffwechsel. Während langsam kontrahierende Typ I-Fasern viele Mitochondrien besitzen und ein oxidativer Stoffwechsel vorliegt, besitzen schneller kontrahierende Typ II-Fasern wenige Mitochondrien und einen oxidativ bis wenig glykolytischen (Typ IIa) oder glykolytischen Stoffwechsel (Typ IIx) (Böhni et al., 2015). Erkrankungen der Mitochondrien können in der Skelettmuskulatur zu Myopathien führen. Hiervon sind in absteigender Häufigkeit in der Skelettmuskulatur die Augenmuskeln, die proximale/axiale Muskulatur, die bulbäre Muskulatur und zuletzt die distale Muskulatur betroffen (Pfeffer und Chinnery, 2013).

Weiterhin existiert möglicherweise ein Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und Fatigue. Eine Übersicht hierzu liefert ein aktuelles Review aus dem Jahr 2014 (Filler et al., 2014).

## 1.9 Ziele und Fragestellung der Arbeit

In der Arbeit sollen unter Verwendung des FMS-Tiermodells mittels intermittierendem Kältestress (ICS) morphologische und molekulare Veränderungen der Skelettmuskulatur (M. gastrocnemius und M. soleus) untersucht und dadurch mögliche neue pharmakologische und therapeutische Ansätze zur Behandlung des FMS gefunden werden.

Ferner soll die Arbeit ermitteln, ob im FMS-Tiermodell geschlechts- bzw. skelettmuskelspezifische Unterschiede existieren.

Hierzu stehen vier Tiergruppen zur Verfügung: 1. Männliche Kontroll-Tiere, 2. männliche ICS-Tiere, 3. weibliche Kontroll-Tiere, 4. weibliche ICS-Tiere. Die ICS-Tiere wurden intermittierendem Kältestress ausgesetzt, während die Kontroll-Tiere bei Raumtemperatur gehalten wurden.

Es wird ein möglicher Einfluss von ICS auf die Morphologie der Skelettmuskulatur am Beispiel des M. gastrocnemius und des M. soleus untersucht. Hierbei wird die Muskulatur in Hinblick auf die Kapillarisierung, Faserdichte, Faserfläche, Fasertypkomposition, Glykogengehalt und Innervation untersucht.

Weiterhin soll die Expression von Genen und Proteinen in der Skelettmuskulatur, welche Angiogenese, Entzündung, Apoptose, Atrophie, Innervation und oxidativen Stress betreffen, betrachtet werden.

Ferner werden auf subzellulärer Ebene (elektronenmikroskopisch) die Anzahl und Größe der Mitochondrien bestimmt und deren Morphologie qualitativ bewertet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

| Geräte                                       | Hersteller   |
|--|--|
| Autoklav Heratherm Oven OMS 100              | Fisher Scientific GmbH, Schwerte                     |
| Bioanalyzer 2100                             | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA          |
| Biofuge Fresco                               | Heraeus Holding GmbH, Hanau                          |
| Brutschrank B 5042                           | Heraeus Holding GmbH, Hanau                          |
| Bunsenbrenner FIREBOY plus                   | INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald                   |
| Chip Priming Station                         | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA          |
| Elektronenmikroskop Zeiss EM 10 C            | Carl Zeiss AG, Oberkochen                            |
| Farbkamera AxioCam MRc                       | Carl Zeiss AG, Oberkochen                            |
| FluoView FV1000 Konfokalmikroskop            | Olympus GmbH, Hamburg                                |
| KMR3 Glass Knifemaker                        | Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar                 |
| Kryostat Hyrax C 60                          | Carl Zeiss AG, Oberkochen                            |
| Magnetrührer IKAMAG® RET-GS, beheizt         | IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen                    |
| Mikroskop Axio Imager. M2                    | Carl Zeiss AG, Oberkochen                            |
| Mikroskop BH-2                               | Olympus GmbH, Hamburg                                |
| MJ-Research PTC-200 Thermocycler             | Global Medical Instrumentation Inc., Ramsey, USA     |
| Multipette plus                              | Eppendorf AG, Hamburg                                |
| NanoDrop 2000C, UV-Vis Spectrophotometer     | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA          |
| pH-Meter 761 Calimatic.                      | Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin |
| Pipetman Classic P10, P20, P100, P200, P1000 | Gilson Inc., Middleton, USA                          |
| Thermoshaker PHMT-PSC-15                     | Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK                |
| Thermozykler Mx3005P QPCR Systems            | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA          |
| TKA GenPure mit xCAD Dispenser               | Thermo Electron LED GmbH, Niederelbert               |
| Ultramikrotom Reichert Ultracut S            | Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar                 |
| UV Sterilizing PCR Workstation               | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen                 |
| Vortexer MS 3                                | IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen                    |
| Waage KB 3600-2N                             | Kern & Sohn GmbH, Balingen                           |
| Zentrifuge Perfect Spin P                    | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen                 |
| Zentrifuge Pico 17                           | Heraeus Holding GmbH, Hanau                          |

**Tabelle 1:** Liste der verwendeten Geräte.

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Material  | Hersteller                                   |
|---|--|
| 96-Loch-Platte  | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA  |
| Combitips plus, 0,5 mL  | Eppendorf AG, Hamburg                        |
| Deckgläser, 24 x 32 mm  | Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig            |
| Diamantmesser Ultra   | Diatome AG, Biel, Schweiz                    |
| Disposable Microtome Blades SEC35e                                  | Microm International GmbH, Walldorf          |
| Einmalkanüle Sterican®, 21G   | B. Braun Melsungen AG, Melsungen             |
| Einmalskalpell  | FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan |
| Einmalspritze Omnifix® 40 Duo                                       | B. Braun Melsungen AG, Melsungen             |
| Filterspitze, 1-200 µl, steril                                      | STARLAB GmbH, Hamburg                        |
| Filterspitze, SafeSeal Tips Premium Cell Saver, 0,1-1000 µl, steril | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf   |
| Glass strips 6.4 x 400 x 25 mm                                      | Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar         |
| Netzträger (Grids), 200 mesh  | Plano GmbH, Wetzlar                          |
| Microcentrifuge Tube w/ lid, 0,5 mL                                 | BrandTech Scientific Inc., Essex, UK         |
| Objektträger mit Mattrand   | Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig            |
| Safe Seal Micro Tube, 1,5 mL und 2 mL                               | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht                 |
| Tube, 15 ml und 50 mL   | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht                 |
| Verschlussstreifen für 96-Loch-Platte                               | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA  |

**Tabelle 2:** Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

### 2.1.3 Reagenzien und Substanzen

| Reagenzien/ Substanzen   | Hersteller  |
|--|---|
| 10x Reaktionspuffer mit MgCl <sub>2</sub>                          | Fisher Scientific, Schwerte                       |
| 2-Methylbutan (Isopentan), ≥ 99 %                                  | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA             |
| 2,4,6-Tri-(dimethylaminomethyl)phenol                              | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg            |
| 2-Dodecenyl-Bernsteinsäureanhydrid                                 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg            |
| Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat (ATP), Grad I, ≥ 99 % | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA             |
| Ammoniumsulfid-Lösung, 21 %  | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA             |
| Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke                                | Fresenius Kabi AG, Bad Homburg                    |
| Blei(II)-nitrat  | Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze |
| Bovines Serumalbumin; Fraktion V                                   | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich       |
| Calciumchlorid-Dihydrat  | Merck KGaA, Darmstadt                             |
| Chloroform   | Merck KGaA, Darmstadt                             |
| Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat                                      | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA             |
| D-(+)-Galactose, ≥ 99 % (G0750)                                    | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA             |



|   |  |
|---|--|
| DePeX Eindeckmittel Gurr®   | VWR International Ltd., Poole, UK            |
| Destilliertes Wasser, DNase/RNase frei  | Life Technologies GmbH, Darmstadt            |
| di-Natriumtetraborat-Decahydrat   | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat  | AppliChem GmbH, Darmstadt                    |
| DNase I, RNase-frei   | Thermo Scientific, Schwerte                  |
| dNTP Mix  | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA  |
| Dulbecco's PBS (1x) (without Ca & Mg)   | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich  |
| Dulbecco's PBS (Powdered Buffer, without Ca & Mg)   | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich  |
| EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)   | Thermo Scientific, Schwerte                  |
| Eosin G   | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| Essigsäure 100 %  | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| Ethanol ≥ 99,7 %, unvergällt  | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg       |
| Ethanol 70 %  | AppliChem GmbH, Darmstadt                    |
| Ethanol 96 %  | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA        |
| Flüssigstickstoff   | Linde AG, München                            |
| Gelatinekapseln   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe           |
| Glutaraldehyd 25 % (wässrige Lösung)  | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg       |
| Glycidether 100   | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg       |
| Glycin  | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| Hämalaunlösung sauer nach Mayer   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe           |
| Hoechst 33342   | Invitrogen, Eugene, USA                      |
| Isopropanol ≥ 99,7%   | AppliChem GmbH, Darmstadt                    |
| Kaisers Glyceringelatine (Eindeckmittel)  | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| Kaliumchlorid   | J.T.Baker, Deventer, Niederlande             |
| Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat   | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| Kaliumhydroxid Plättchen, rein  | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| Lectin von <i>Bandeiraea simplicifolia</i> , Biotin-konjugiert (L3759)  | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA        |
| Lectin von <i>Bandeiraea simplicifolia</i> , Isolectin B <sub>4</sub> (BSI-B <sub>4</sub> ), POD-konjugiert (L5391) | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA        |
| Methylnadicanhydrid   | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg       |
| Natronlauge (NaOH [1 mol/l])  | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| Oligo (dt) <sub>18</sub> -Primer  | Fisher Scientific, Schwerte                  |
| Osmiumtetroxid  | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg       |
| Paraformaldehyd   | Merck KGaA, Darmstadt                        |
| peqGOLD TriFast   | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen         |
| Perjodsäure   | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA        |
| Peroxid-Puffer  | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim |
| Pferdeserum (Donor Horse Serum)   | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich  |
| Pikrinsäure   | Merck KGaA, Darmstadt                        |

|  |  |
|--|--|
| Propylenoxid                                 | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg                       |
| Pyronin G                                    | WALDECK GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster              |
| QPCR Mouse Reference Total RNA (750600)      | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA                  |
| RiboLock RNase Inhibitor                     | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA                  |
| RNase Away                                   | Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA                   |
| Salzsäure 1 mol/l                            | Merck KGaA, Darmstadt  |
| Schiff's Reagenz                             | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA                        |
| Schweineserum (Porcine Serum)                | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich                  |
| Shandon Immu-Mount                           | Fisher Scientific GmbH, Schwerte                             |
| Streptavidin, Cy2-konjugiert                 | Jackson ImmunoResearch Laboratories. Inc., West Grove, USA   |
| Tissue-Tek                                   | Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande |
| Toluidinblau O                               | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg                       |
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat                   | Merck KGaA, Darmstadt  |
| Triton X-100                                 | Sigma-Aldrich Co. LLC, ST. Louis, USA                        |
| Uranylacetat- Dihydrat                       | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg                       |
| Wasserstoffperoxid 30 %                      | Merck KGaA, Darmstadt  |
| Xylol (Isomere) > 98 %, rein                 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe                           |
| $\alpha$ -Bungarotoxin, Biotin-XX-konjugiert | Life Technologies GmbH, Darmstadt                            |

**Tabelle 3:** Liste der verwendeten Reagenzien und Substanzen.

#### 2.1.4 Verwendete Kits

| Kit  | Inhalt  | Hersteller                                  |
|--|---|---|
| Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase | <ul style="list-style-type: none"> <li>AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase</li> <li>10x AffinityScript RT Puffer</li> <li>100 mM DTT</li> </ul>   | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA |
| Agilent RNA 6000 Nano Kit                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Agilent RNA 6000 Nano Chips</li> <li>Elektronenreiniger-Chips</li> <li>Agilent RNA 6000 Ladder</li> <li>RNA Nano Dye Konzentrat</li> <li>Agilent RNA 6000 Nano Marker</li> <li>Agilent RNA 6000 Nano Gel Matrix</li> </ul> | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA |

|  |   |  |
|--|---|--|
| Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2× Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix</li> <li>• ROX Reference dye (1 mM)</li> </ul> | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA  |
| Diaminobenzidin (DAB, POD-Substrat)                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• DAB/metal concentrate (x10)</li> <li>• Peroxid-Puffer</li> </ul>                                       | Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim |
| StreptABComplex/POD                                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Streptavidin</li> <li>• Biotinylierte POD</li> <li>• Mischflasche</li> </ul>                           | DakoCytomation, Glostrup, Dänemark           |

Tabelle 4: Liste der verwendeten Kits.

### 2.1.5 Antikörper

| Antikörper                | Beschreibung  | Katalog-nummer | Firma   | Verdünnung |
|---------------------------|---|----------------|---|------------|
| <i>Primärantikörper</i>   |   |                |   |            |
| Anti-CD68                 | Monoklonaler Ratte anti-Maus CD68 Antikörper            | MCA1957        | AbD Serotec, Kidlington, UK                               | 1:50       |
| Anti-Cyclooxygenase 2     | Polyklonaler Kaninchen anti-Cyclooxygenase 2 Antikörper | ab15191        | Abcam plc., Cambridge, UK                                 | 1:100      |
| Anti-Fbxo32               | Polyklonaler Kaninchen anti-Fbxo32 Antikörper           | ab74023        | Abcam plc., Cambridge, UK                                 | 1:200      |
| Anti-IL-1β                | Polyklonaler Kaninchen anti-IL-1β Antikörper            | ab9722         | Abcam plc., Cambridge, UK                                 | 1:100      |
| Anti-MIF                  | Polyklonaler Kaninchen anti-MIF Antikörper              | ab7207         | Abcam plc., Cambridge, UK                                 | 1:100      |
| Anti-MuRF1 (H-145)        | Polyklonaler Kaninchen anti-MuRF1 (H-145) Antikörper    | sc- 32920      | Santa Cruz Biotechnology Inc.; Dallas, USA                | 1:100      |
| <i>Sekundärantikörper</i> |   |                |   |            |
| Anti-Kaninchen IgG        | Cy3-konjugierter Affe anti-Kaninchen Antikörper         | 711-165-152    | Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA | 1:100      |
| Anti-Kaninchen IgG        | Polyklonaler POD-konjugierter Ziege anti-               | ZRH1158        | LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossen-                | 1:200      |

|                | Kaninchen Anti-körper  |        | heim                           |       |
|----------------|--|--------|--------------------------------|-------|
| Anti-Ratte IgG | Polyklonaler<br>POD-konjugierter<br>Ziege anti-Ratte<br>Antikörper | STAR72 | AbD Serotec,<br>Kidlington, UK | 1:100 |

**Tabelle 5:** Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper mit den eingesetzten Konzentrationen.

### 2.1.6 Primer

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Qiagen GmbH, Hilden; Deutschland.

| Primer   | Symbol      | Amplikonlänge (bp) | Katalognummer |
|--|-------------|--------------------|---------------|
| Actin, beta  | Actb        | 77                 | QT01136772    |
| B cell leukemia/lymphoma 2                                       | BCL2        | 104                | QT02392292    |
| BCL2-associated X protein  | Bax         | 78                 | QT00102536    |
| Caspase 3  | Casp3       | 150                | QT01164779    |
| CD68 antigen   | CD68        | 67                 | QT00254051    |
| Cholinergic receptor, nicotinic, $\alpha$ polypeptide 1 (muscle) | Chrna1      | 94                 | QT00109942    |
| F-box protein 32   | Fbxo32      | 103                | QT00158543    |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                         | Gapdh       | 144                | QT01658692    |
| Interleukin 1- $\beta$   | Il1 $\beta$ | 150                | QT01048355    |
| Interleukin 6  | Il6         | 128                | QT00098875    |
| Kinase insert domain protein receptor                            | Kdr         | 95                 | QT02519972    |
| Macrophage migration inhibitory factor                           | MIF         | 95                 | QT00247618    |
| Notch gene homolog 1 (Drosophila)                                | Notch1      | 102                | QT00156982    |
| Notch gene homolog 3 (Drosophila)                                | Notch3      | 104                | QT01051729    |
| Prostaglandin-endoperoxide synthase 2                            | COX- 2      | 95                 | QT00165347    |
| Ribosomal protein L32  | Rpl32       | 88                 | QT01752387    |
| Superoxide dismutase 2, mitochondrial                            | Sod2        | 159                | QT00161707    |
| Suppressor of cytokine signaling 3                               | Socs3       | 90                 | QT02488990    |

|                                      |        |     |            |
|--------------------------------------|--------|-----|------------|
| TATA box binding protein             | Tbp    | 114 | QT00198443 |
| Tripartite motif-containing 63       | Trim63 | 116 | QT00291991 |
| Tumor necrosis factor                | Tnf    | 112 | QT00104006 |
| Vascular endothelial growth factor A | Vegfa  | 117 | QT00160769 |
| Vascular endothelial growth factor B | Vegfb  | 125 | QT01059863 |

**Tabelle 6:** Liste der verwendeten Primer.

### 2.1.7 Software

| Anwendung/Gerät                                | Software                 | Firma  |
|--|--------------------------|--|
| Elektronenmikroskopie                          | ImageSP Viewer 1.1.2.39  | SYSPROG, Minsk, Weißrussland                       |
| Grafische Darstellungen                        | Microsoft Excel 2010     | Microsoft Corporation, Redmond, USA                |
| Detektion des besten „house-keeping“ Gens      | NormFinder.xla           | Molecular Diagnostics Laboratories, Covington, USA |
| Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen | AxioVision Release 4.8.2 | Carl Zeiss, AG, Oberkochen                         |
| Lichtmikroskopische Auswertung                 | Image J 1.45s            | National Institutes of Health, USA                 |
| Real Time PCR                                  | MxPro QPCR Software      | Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA        |
| Statistische Analyse                           | Sigma Plot 12.0          | Systat Software, Inc, Chicago, USA                 |

**Tabelle 7:** Liste der verwendeten Software.

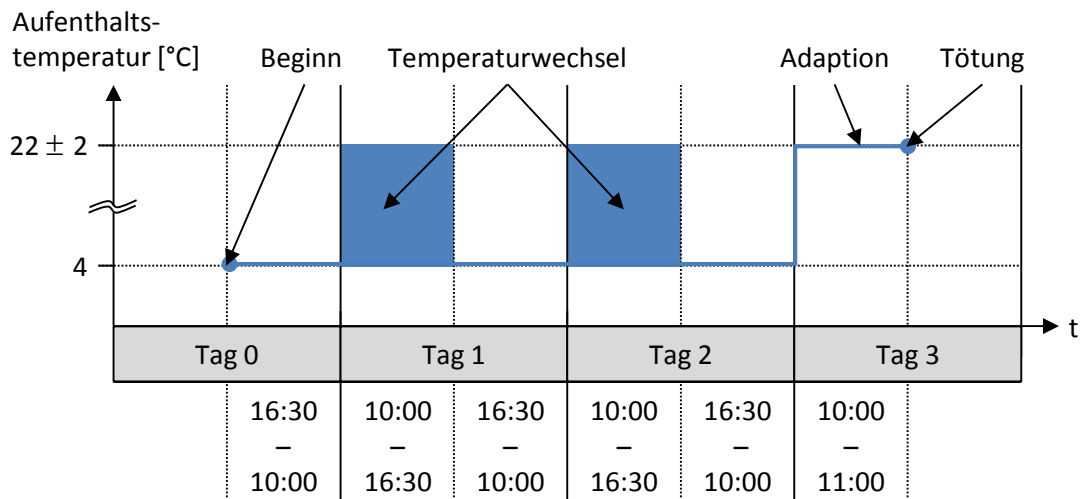
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Intermittierender Kältestress (ICS)-Mausmodell

Es wurde das Tiermodell des ICS verwendet, das zur Untersuchung des FMS genutzt wird (Nishiyori et al., 2010).

Während die ICS-Tiere dem ICS ausgesetzt waren, wurden die Kontrolltiere die gesamte Zeit bei  $22 \pm 2$  °C gehalten. Die ICS-Tiere wurden jeweils von 16:30 Uhr bis 10:00 Uhr bei 4 °C gehalten. Zwischen 10:00 Uhr und 16:30 Uhr wurde die Temperatur jeweils im 30-minütigen Wechsel zwischen  $22 \pm 2$  °C und 4 °C variiert ([Abbildung 10](#)).

An Tag 3 wurden die Tiere nach einer Stunde Adaption bei Raumtemperatur getötet ([Abbildung 10](#)). Beide Tiergruppen hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter. Ein vom Regierungspräsidium Gießen genehmigter Tierversuchsantrag liegt vor (V 54 - 19 c 20 15 (1) MR 20/19 Nr. 8/2012).



**Abbildung 10:** Behandlungsverlauf der ICS-Tiere.

### 2.2.2 Materialgewinnung und Materialvorbereitung

Für das Mausmodell wurden insgesamt 18 männliche und 17 weibliche je sechs Wochen alte C57BL/6N-Mäuse herangezogen. Von diesen wurde ein M. triceps surae (M. soleus und M. gastrocnemius) freipräpariert, für (immun)histochemische, molekularbiologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen entnommen und asserviert.

Materialvorbereitung für (immun)histochemische und molekularbiologische Untersuchungen:

1. Nach Entnahme des Gewebes Bettung der Gewebeproben auf Tissue Tek.
2. Schockgefrieren mit Flüssigstickstoff-gekühltem 2-Methylbutan und Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
3. Anfertigung von  $7\text{ }\mu\text{m}$  dicken Muskelquerschnitten für die (Immun)histochemie mit Hilfe eines Kryostat bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  und Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Materialvorbereitung für die molekularbiologische Analyse:

1. Auswählen von Gewebe von jeweils fünf weiblichen und fünf männlichen Tieren aus ICS- bzw. Kontrolltieren.
2. Präparation von jeweils einer circa  $3\text{ mm}^3$  großen Gewebeproben des M. gastrocnemius und eine circa  $1\text{ mm}^3$  große Probe des M. soleus pro Tier mit Hilfe von Einwegskalpell und einer Pinzette bei  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
3. Überführen der Gewebeproben in autoklavierte und gekühlte Cups.
4. Schockgefrieren der Cups in Flüssigstickstoff und Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung.

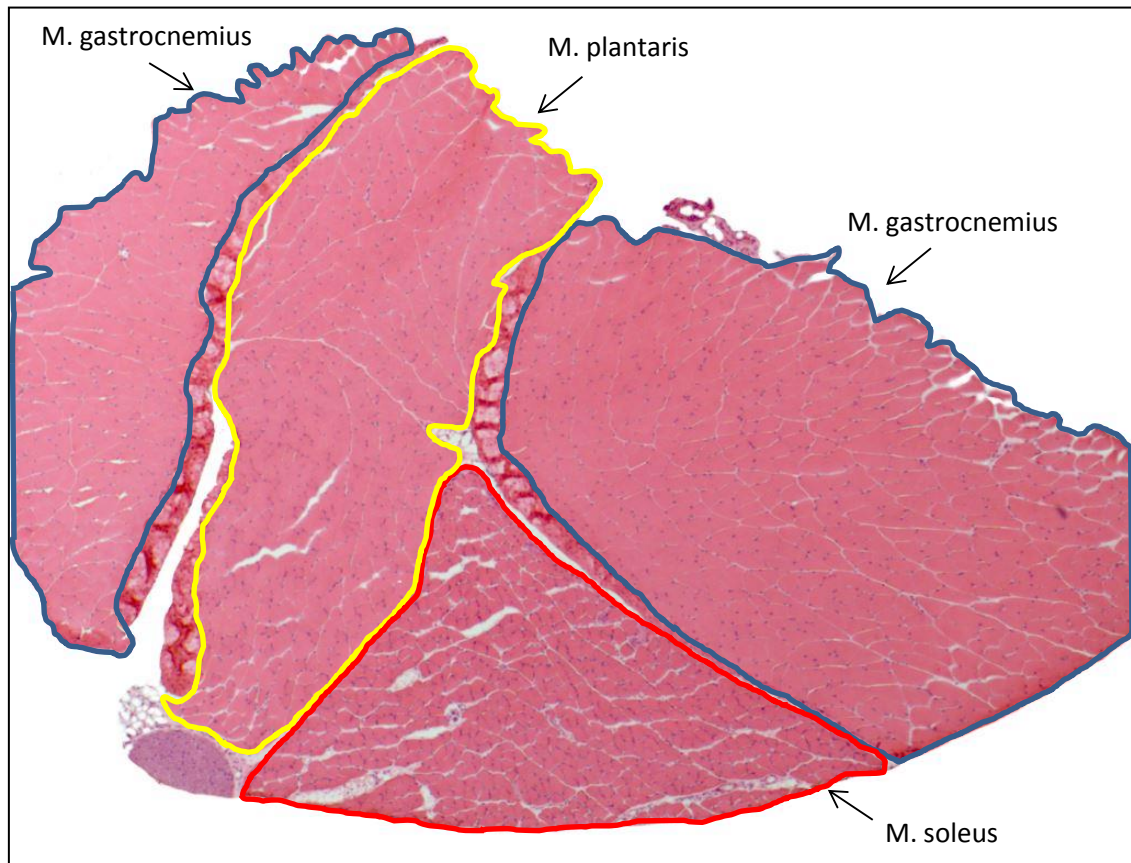
Materialvorbereitung für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen:

1. Präparation des Gewebes in  $0,1\text{ M}$  Cacodylatpuffer ([vgl. 2.2.5.2](#)) und Zuschneiden auf eine Größe von ca.  $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  nach Entnahme der Muskelproben.
2. Immersionsfixation in Ito-Fixans ([vgl. 2.2.5.2](#)) und Lagerung der Proben bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung.

### 2.2.3 Färbungen

#### 2.2.3.1 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin/Eosin

Von den angefertigten Kryoschnitten wurden zur Orientierung im Präparat und zur Überprüfung der Schnittebene HE-Färbungen angefertigt ([Abbildung 11](#)).



**Abbildung 11:** Übersicht über ein Muskelpräparat. HE-Färbung. Originalvergrößerung: x40.

#### Durchführung:

1. Zur Kernfärbung Inkubation der Präparate für 30 Sekunden in Hämalaun nach Meyer.
2. Bläuen der Kerne für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser.
3. Zur Cytoplasmafärbung Inkubation der Muskelschnitte für vier Minuten in 0,2 % wässrigem Eosin G.
4. Waschen für vier Minuten in A. dest.
5. Entwässerung in einer Alkoholreihe (96 % Ethanol,  $\geq 99,7$  % Isopropanol,  $\geq 99,7$  % Isopropanol, jeweils vier Minuten) und anschließende Inkubation für insgesamt zwölf Minuten in  $> 98$  % Xylol.



6. Eindecken der Schnitte mit Hilfe von DePex unter einem Deckglas.

### **2.2.3.2 Kapillarfärbung mit Lectin von *Bandeiraea simplicifolia* (Isolectin B<sub>4</sub>)**

Zum Anfärben der Kapillaren in den Muskelschnitten wurde das peroxidase-konjugierte Isolectin B<sub>4</sub> von *Bandeiraea simplicifolia* (BSI-B<sub>4</sub>) verwendet. Das Isolectin B<sub>4</sub> bindet spezifisch an terminale  $\alpha$ -Galactosyl-Reste und wird zum Färben von Endothel verwendet (Kirkeby et al., 1993). Die an das hier verwendete Lectin konjugierte Peroxidase oxidiert das in der Reaktion eingesetzte DAB zu einem braunen Endprodukt, das zur Identifizierung der Gefäße führt.

#### Ansetzen der benötigten Substanzen und Reagenzien:

##### Lösung 1: 0,01 % Tritonlösung

- Verdünnung von Triton X-100 mit PBS zu einer 0,01 % Tritonlösung.

##### Lösung 2: Lectin-Inkubationslösung

- Herstellung einer Lectin-Inkubationslösung mit einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/mL}$  (aus Lösung 1).

##### Lösung 3: Galactose-Lectin-Lösung (negative Kontrolle)

- Anfertigung einer Galactose-Lectin-Lösung (Lectin 40  $\mu\text{g/mL}$  / D-(+)-Galactose 80  $\mu\text{g/mL}$ ).
- Zur Lectin-Galactose-Bindung Lagerung für 30 min bei 37 °C.

#### Durchführung:

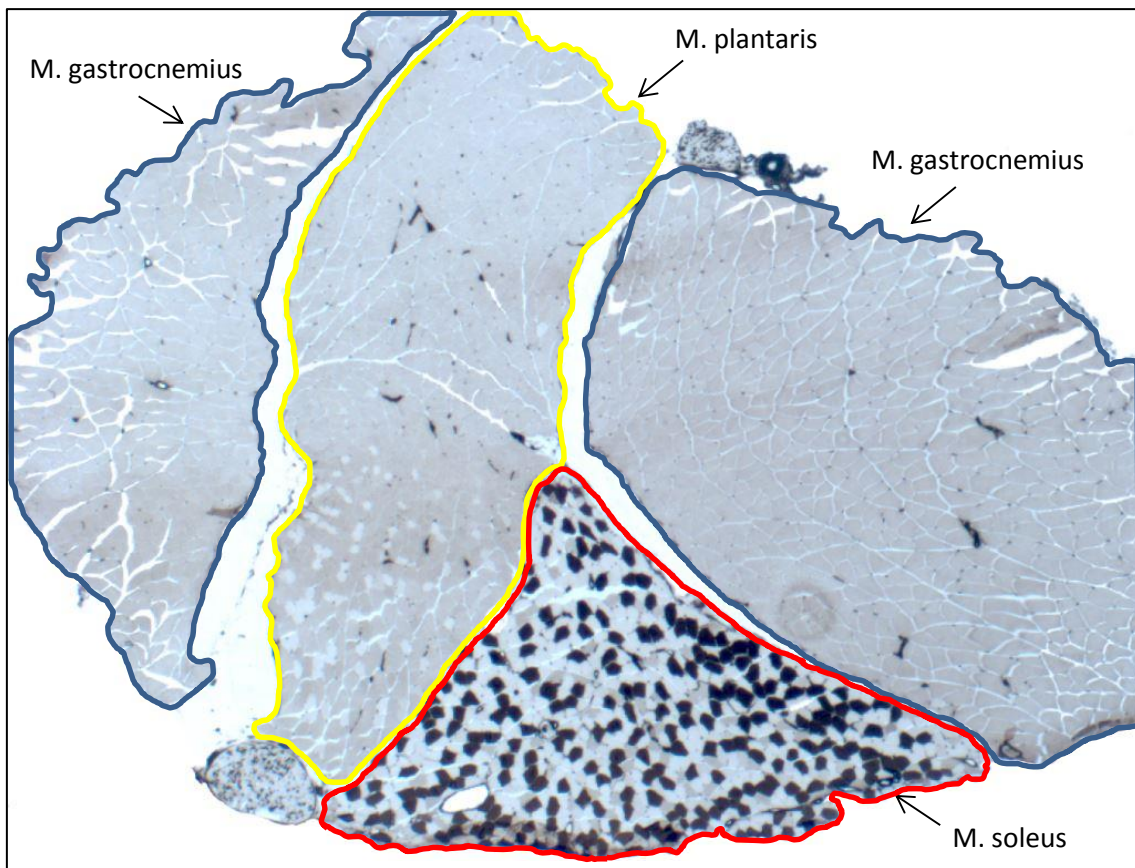
1. Fixierung der Schnittpräparate für zehn Minuten in 4 % PFA.
2. Waschen der Muskelquerschnitte für dreimal fünf Minuten in PBS.
3. Blocken der endogenen Peroxidase für 15 Minuten mit 0,05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
4. Waschen für zweimal fünf Minuten in PBS.

5. Überschichten der Präparate mit der Lectin-Inkubationslösung (Lösung 2) oder der Galactose-Lectin-Lösung (Lösung 3) und Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C für eine Stunde.
6. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
7. Bedecken der Schnitte mit dem DAB-Substrat (1:10 mit PBS verdünnt) für fünf Minuten.
8. Waschen für dreimal fünf Minuten mit PBS.
9. Kernfärbung der Präparate für 30 Sekunden in Hämalaun nach Meyer.
10. Bläuen der Kerne für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser.
11. Entwässerung in einer Alkoholreihe (96 % Ethanol,  $\geq 99,7$  % Isopropanol,  $\geq 99,7$  % Isopropanol, jeweils vier Minuten) und anschließende Inkubation für insgesamt zwölf Minuten in  $> 98$  % Xylol.
12. Eindecken der Schnitte mit Hilfe von DePex unter einem Deckglas.

Bei den Negativkontrollen wurden die Schnitte anstelle der Lectin-Inkubationslösung (Lösung 2) mit der Galactose-Lösung (Lösung 3) überschichtet und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Danach wurden sie bis zum Eindecken unter einem Deckglas wie bereits oben geschildert versorgt.

#### **2.2.3.3 ATPase-Färbung**

Um die unterschiedlichen Fasertypen in den Präparaten des M. gastrocnemius und des M. soleus zu identifizieren wurde bei den Schnittpräparaten die ATPase-Färbung verwendet ([Abbildung 12](#)). Hierdurch werden die Typ I-Fasern schwarz bis dunkelbraun, die Typ IIx-Fasern braun bis hellbraun und die Typ IIa-Fasern hellbraun bis weiß gefärbt und lassen sich so unterscheiden ([Abbildung 17](#)).



**Abbildung 12:** Übersicht über ein Muskelpräparat. ATPase-Färbung. Originalvergrößerung: x40.

### Ansetzen der benötigten Substanzen und Reagenzien:

#### Lösung 1: Saurer Vorinkubationspuffer

- Hinzufügen von 7,46 g KCl (0,1 M) und 3,6 mL 100 % Essigsäure ad 1000 mL Ampuwa .
- pH-Einstellung mit KOH auf pH = 4,6.

#### Lösung 2: Ausgleichspuffer

- Hinzugeben von 0,751 g Glycin (40 mM) und 0,735 g  $\text{CaCl}_2$  (20 mM) ad 250 mL Ampuwa.
- pH-Einstellung mit KOH auf pH = 9,4.

#### Lösung 3: ATP-Inkubationslösung

- pH-Einstellung von 10 mL des Ausgleichspuffers (Lösung 2) mit KOH auf pH = 9,7.
- Hinzufügen und Lösen von 15 mg ATP.

- Es entsteht eine leicht trübe Lösung.

#### Lösung 4 : 1 % Calciumchlorid-Lösung

- Hinzugeben und Lösen von 6,62 g  $\text{CaCl}_2$  ad 500 mL A. dest.

#### Lösung 5: 2 % Cobaltchlorid-Lösung

- Hinzufügen und Lösen von 3,66 g  $\text{CoCl}_2$  ad 100 mL A. dest.

#### Lösung 6: 1 % Ammoniumsulfid-Lösung

- Hinzugeben von 11,9 mL 21 % Ammoniumsulfidlösung ad 250 mL A. dest.

#### Durchführung:

1. Präinkubation der Schnittpräparate für fünf Minuten im sauren Vorinkubationspuffer (Lösung 1) bei Raumtemperatur.
2. Platzieren der Muskelquerschnitte in eine Küvette mit Ausgleichspuffer (Lösung 2) für eine Minute.
3. Überschichten der Kryoschnitte mit der ATP-Inkubationslösung (Lösung 3) und Inkubation für 18 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.
4. Waschen für jeweils dreimal 30 Sekunden in der 1 %  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (Lösung 4).
5. Komplexieren des Phosphats in der 2 %  $\text{CoCl}_2$ -Lösung (Lösung 5) für drei Minuten.
6. Waschen für dreimal 30 Sekunden in A. dest.
7. Eintauchen der Muskelschnitte in die 1 % Ammoniumsulfidlösung (Lösung 6) für 30 Sekunden.
8. Zweimaliges Waschen für jeweils eine Minute in A. dest.
9. Eindecken der Schnitte mit Hilfe erwärmter Kaisers Glyceringelatine unter einem Deckglas.

#### **2.2.3.4 Perjodsäure-Schiff-Reaktion-Färbung**

Um die intramuskuläre Glykogenspeicherung darzustellen wurde bei Kryoschnitten eine PAS (engl. „*periodic acid-Schiff reaction*“)-Färbung durchgeführt. Dabei färbt sich

das in Muskelzellen vorhandene Glykogen purpurrot. Die Zellkerne sind nach Verwendung von Hämalaun (nach Meyer) blau gefärbt.

#### Ansetzen der benötigten Substanzen und Reagenzien:

##### Lösung 1: 1 % Perjodsäure

- Lösen von 1 g Perjodsäure in 100 mL A. dest.

#### Durchführung:

1. Fixierung der Kryoschnitte in 4 % PFA für zehn Minuten.
2. Waschen unter fließendem Leitungswasser für eine Minute.
3. Überschichten mit 1 % Perjodsäure (Lösung 1) und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur.
4. Waschen mit A. dest. für dreimal fünf Minuten.
5. Inkubation der Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer Küvette mit Schiff's Reagenz.
6. Waschen unter fließendem Leitungswasser für fünf Minuten.
7. Kernfärbung der Präparate für 30 Sekunden in Hämalaun nach Meyer.
8. Bläuen der Kerne für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser.
9. Entwässerung in einer Alkoholreihe (96 % Ethanol,  $\geq 99,7$  % Isopropanol,  $\geq 99,7$  % Isopropanol, jeweils vier Minuten) und anschließende Inkubation für insgesamt zwölf Minuten in  $> 98$  % Xylol.
10. Eindecken der Schnitte mit Hilfe von DePex unter einem Deckglas.

#### **2.2.3.5 $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung**

Zur Darstellung und Analyse der motorischen Endplatten der Muskelfasern wurde das aus dem Schlangengift der Kraits *Bungarus multicinctus* extrahierte  $\alpha$ -Bungarotoxin verwendet. Dieses bindet irreversibel an postsynaptische nikotinerge

Acetylcholinrezeptoren an der motorischen Endplatte (Nirathanan und Gwee, 2004). Die Reaktion erfolgt in der hier verwendeten Methode mit Hilfe der starken Affinität von Streptavidin für Biotin.

#### Ansetzen der benötigten Substanzen und Reagenzien:

##### Lösung 1: 2 % Rinderalbumin-Lösung

- Herstellen einer 10 % Rinderalbumin-Lösung mit Hilfe von Rinder-Serumalbumin und A. dest.
- Verdünnen auf 2 % Rinderalbumin-Lösung mit PBS.

##### Lösung 2: Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex-Lösung

- Versetzen von 5 mL PBS mit einem Tropfen Streptavidin und einem Tropfen biotinylierter Peroxidase.
- Vor der Anwendung muss diese Lösung für ungefähr 30 Minuten inkubieren.

#### Durchführung:

1. Fixierung der Schnittpräparate für zehn Minuten in 4 % PFA.
2. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
3. Blocken der endogenen Peroxidase durch Inkubation der Schnitte für fünf Minuten in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
4. Überschichten der Muskelquerschnitte über Nacht mit dem biotinylierten  $\alpha$ -Bungarotoxin (2 ng/ $\mu$ l).
5. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
6. Blocken der endogenen Peroxidase durch Inkubation der Schnitte für 20 Minuten mit der 2 % Rinderalbuminlösung (Lösung 1).
7. Einmal fünf Minuten mit PBS waschen.
8. Überschichten der Präparate mit der Streptavidin–Biotin-Enzymkomplex-Lösung (Lösung 2).

9. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
10. Bedecken der Schnitte mit der DAB-Substrat-Lösung (1:10 verdünnt mit PBS) für fünf Minuten.
11. Fünfmaliges Waschen mit PBS für jeweils drei Minuten.
12. Kernfärbung der Präparate für 30 Sekunden in Hämalun nach Meyer.
13. Bläuen der Kerne für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser.
14. Entwässerung in einer Alkoholreihe (96 % Ethanol,  $\geq 99,7$  % Isopropanol,  $\geq 99,7$  % Isopropanol, jeweils vier Minuten) und anschließende Inkubation für insgesamt zwölf Minuten in  $> 98$  % Xylol.
15. Eindecken der Schnitte mit Hilfe von DePex unter einem Deckglas.

Bei den Negativkontrollen wurden die Schnitte über Nacht mit PBS, anstelle von  $\alpha$ -Bungarotoxin, inkubiert. Danach erfolgte die oben beschriebene weitere Behandlung.

#### **2.2.3.6 Immunhistochemische Einfachfärbungen**

Die Muskelschnitte wurden mit folgenden Antikörpern für immunhistochemische Untersuchungen inkubiert: anti-CD68, anti-Fbxo32, anti-IL-1 $\beta$ , anti-MIF, anti-MuRF1.

##### Durchführung:

1. Fixierung der Gewebeschnitte in 4 % PFA für zehn Minuten.
2. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
3. Blocken der endogenen Peroxidase mit 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für zwei Minuten.
4. Waschen für zweimal fünf Minuten in PBS.
5. Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 1 % Schweine-/Pferdeserum für 30 Minuten.
6. Waschen mit PBS für einmal fünf Minuten.

7. Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern in der jeweiligen Verdünnung ([Tabelle 5](#)) über Nacht bei 4 °C.
8. Am nächsten Morgen Waschen der Präparate für dreimal fünf Minuten in PBS.
9. Inkubation mit den jeweiligen POD-konjugierten Sekundärantikörpern in der jeweiligen Verdünnung ([Tabelle 5](#)) für eine Stunde im Wärmeschrank bei 37 °C.
10. Waschen mit PBS für zweimal fünf Minuten.
11. Visualisierung der Reaktion mit Hilfe des DAB-Substrats (1:10 verdünnt mit PBS).
12. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
13. Kernfärbung
  - a) Bei Verwendung der Primärantikörper anti-Fbxo32, anti-IL-1 $\beta$ , anti-MIF und anti-MuRF1:
    - Kernfärbung mit Hilfe einer Hoechst 33342-Lösung (1  $\mu$ g/mL) für fünf Minuten.
    - Waschen für fünfmal drei Minuten in PBS.
    - Eindecken der Schnitte mit Shandon Immu-Mount unter einem Deckglas.
  - b) Bei Verwendung der Primärantikörper anti-CD68:
    - Kernfärbung der Präparate für 30 Sekunden in Hämalun nach Meyer.
    - Bläuen der Kerne für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser.
    - Entwässerung in einer Alkoholreihe (96 % Ethanol,  $\geq$  99,7 % Isopropanol,  $\geq$  99,7 % Isopropanol, jeweils vier Minuten) und anschließende Inkubation für insgesamt zwölf Minuten in  $>$  98 % Xylol.
    - Eindecken der Schnitte mit Hilfe von DePex unter einem Deckglas.



Die Negativkontrollen wurden über Nacht mit PBS (anstelle eines Primärantikörpers) überschichtet. Danach wurden sie wie die mit Primärantikörper inkubierten Muskelschnitte weiter behandelt.

### 2.2.3.7 Immunhistochemische Doppelfärbungen

Bei der immunhistochemischen Doppelfärbung der Muskelschnitte wurden Primärantikörper und ein biotinkoppeltes Lectin von *Bandeiraea simplicifolia* (BSI) auf dem selben Gewebeschnitt eingesetzt. Das biotinkoppelte Lectin wurde mit Hilfe eines Cy2-konjugierten Streptavidins detektiert. Die Doppelfärbetechnik wurde in Verbindung mit anti-COX-2-Antikörpern eingesetzt. Die Lokalisation der Primärantikörper (anti-COX-2) wurde mit Hilfe POD-konjugierter Sekundärantikörper und des DAB-Substrats sichtbar gemacht.

Für die Untersuchung der Lokalisation von COX-2 in Gefäßen wurden biotinyliertes Lectin mit Cy2-konjugiertem Streptavidin und anti-COX-2 Primärantikörper mit Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern gleichzeitig auf einem Schnittpräparat verwendet.

#### Durchführung:

1. Behandlung der Muskelquerschnitte bis nach den Block- und Waschvorgängen wie bei der oben beschriebenen immunhistochemischen Einfachfärbung ([vgl. 2.2.3.6](#)).
2. Gleichzeitige Inkubation mit den anti-COX-2 Primärantikörpern in der jeweiligen Konzentration ([Tabelle 5](#)) und dem biotin-konjugierten Lectin (10 µg/ml) über Nacht bei 4 °C.
3. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
4. Inkubation mit den Sekundärantikörpern
  - a) Für die quantitative COX-2-Bestimmung:
    - Inkubation mit den POD-konjugierten Ziege anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörpern für 50 Minuten im Wärmeschrank bei 37 °C.
  - b) Für die Identifizierung der Co-Lokalisation von COX-2 in Gefäßen:

- Inkubation mit den Cy3-konjugierten Affe anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörpern für 50 Minuten im Wärmeschrank bei 37 °C.
5. Waschen der Schnitte für dreimal fünf Minuten in PBS.
  6. Inkubation mit dem Cy2-konjugierten Streptavidin (1:500 in PBS verdünnt) für 20 Minuten bei Raumtemperatur.
  7. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
  8. Visualisierung der Peroxidasereaktion mit Hilfe des DAB-Substrats (1:10 verdünnt mit PBS) (dieser Schritt entfällt bei den Schnitten zur Untersuchung der Co-Lokalisation von COX-2 in Gefäßen).
  9. Waschen für dreimal fünf Minuten in PBS.
  10. Kernfärbung mit Hilfe einer Hoechst 33342-Lösung (1 µg/ml) für fünf Minuten.
  11. Waschen für fünfmal drei Minuten in PBS.
  12. Eindecken der Schnitte mit Shandon Immu- Mount unter einem Deckglas.

Die Negativkontrollen wurden über Nacht mit dem biotin-konjugierten Lectin (10 µg/mL) anstelle der Primärantikörper überschichtet. Ansonsten wurden sie genauso behandelt wie bereits oben beschrieben.

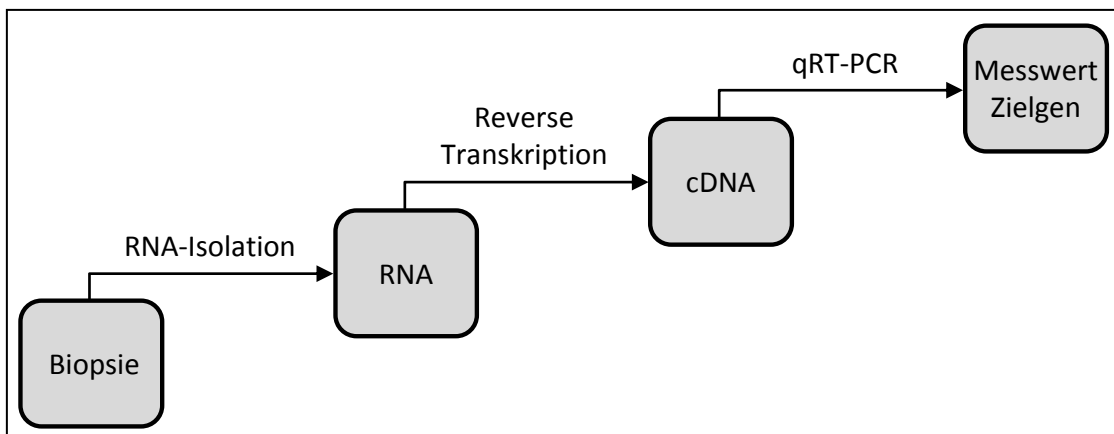
Bei der gesamten Reaktion wurde darauf geachtet, dass, sobald ein fluoreszierender Farbstoff eingesetzt wurde, die Schnitte vor Licht geschützt waren und diese deshalb im Dunkeln inkubiert wurden.

## 2.2.4 Molekularbiologische Analyse der Muskelbiopsieproben

### 2.2.4.1 Übersicht

Mit Hilfe der quantitativen Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) lässt sich die Expression eines spezifischen Genabschnittes quantitativ messen.

Zunächst wird die RNA aus den Muskelbiopsieproben isoliert. Danach wird die RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als nächstes findet die quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion statt, bei der spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Nach Ablauf der Polymerasekettenreaktion kann die Menge der nun vorliegenden DNA mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in doppelsträngige DNA interkaliert, quantitativ gemessen werden ([Abbildung 13](#)).



**Abbildung 13:** Übersicht über die Vorgehensweise zur molekularen Analyse der Muskelbiopsieproben.

### 2.2.4.2 Extraktion der RNA

#### Vorbereitung des Gewebes:

1. Zerkleinerung des Muskelgewebes mit Hilfe von autoklavierten Mörsern und Stößeln, die zuvor mit Hilfe von Flüssigstickstoff abgekühlt wurden.
2. Überführung des zerkleinerten Gewebes in ein gekühltes, steriles Cup.
3. Poolen des Gewebes von jeweils fünf Mäusen einer Gruppe in einem Cup, da die gewonnen Muskelmenge pro Maus und Muskel sehr gering war.

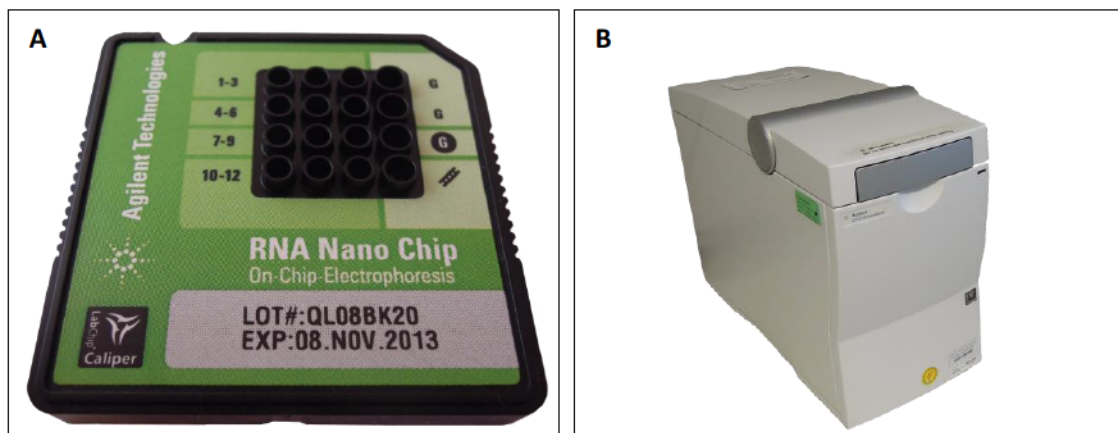
Durchführung:

1. Homogenisierung des Gewebes mit peqGOLD TriFast (M. soleus: 0,5 mL, M. gastrocnemius: 1 mL).
2. Stehenlassen der Proben für fünf Minuten bei Raumtemperatur zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe.
3. Hinzugeben von Chloroform (M. soleus: 0,1 mL, M. gastrocnemius 0,2 mL) und kräftiges Schütteln der Proben für 15 Sekunden zur Phasentrennung von RNA, DNA und Proteinen.
4. Stehenlassen der Proben für fünf Minuten bei Raumtemperatur.
5. Zentrifugation der Cups mit 12.000 x g mit Hilfe der Biofuge Fresco für fünf Minuten. Es haben sich nun die drei Phasen gebildet.
6. Abnehmen der oberen wässrigen Phase, die die RNA enthält, und Überführen in ein neues Cup.
7. Erneute Zugabe von Chloroform (M. soleus: 0,1 mL, M. gastrocnemius 0,2 mL) und kräftiges Schütteln der Proben für 15 Sekunden.
8. Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für fünf Minuten.
9. Zentrifugation der Cups mit 12.000 x g für fünf Minuten.
10. Abnehmen der oberen wässrigen Phase, die die RNA enthält, und Überführen in ein neues Cup.
11. Zugabe von Isopropanol (M. soleus: 0,25 mL, M. gastrocnemius: 0,5 mL) zur Präzipitation der RNA und anschließendes gutes Mischen der Proben.
12. Zum Fällern der RNA Inkubation der Proben für 15 Minuten auf Eis.
13. Zentrifugation der Proben mit 12.000 x g bei 4 °C für 30 Minuten.
14. Abpipettieren des Isopropanolüberstandes und einmaliges Waschen des entstandenen RNA-Pellets mit 70 % Ethanol (M. soleus: 250 µl, M. gastrocnemius: 500 µl) und anschließend kurzes Vortexen.
15. Zentrifugation für zehn Minuten mit 12.000 x g bei 4 °C.
16. Abpipettieren des 70 % Ethanol-Überstandes. Pellets an der Luft trocknen lassen.

17. Lösen der Proben in 25 µl RNase- und DNase-freiem Wasser. Um das genannte RNase- und DNase-freie Wasser zu erhalten wurde 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl) zu 99 µl destilliertem RNase- und DNase-freiem Wasser gegeben.
18. Inkubation der RNA für zehn Minuten bei 60 °C im Thermoshaker PHMT-PSC-15 zum besseren Lösen der RNA.

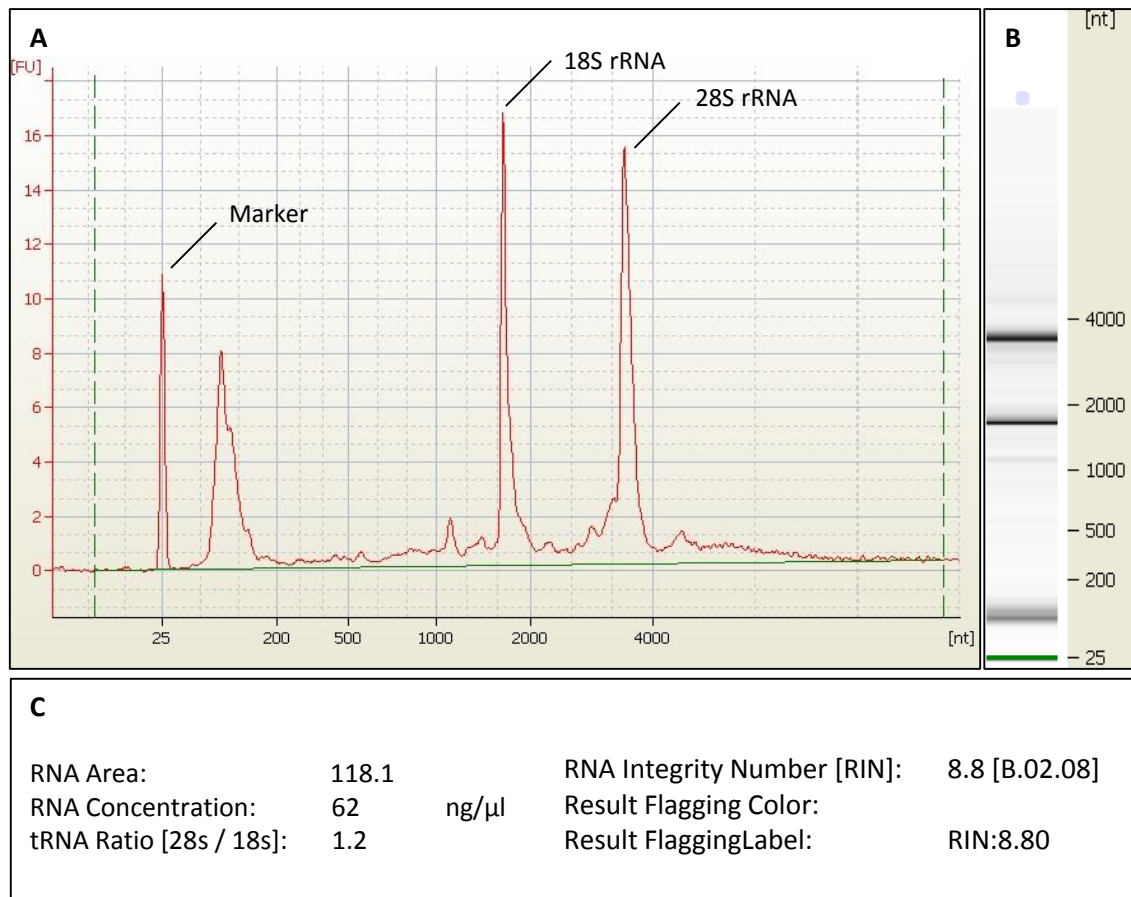
Um Reinheit und Konzentration der RNA-Lösungen zu bestimmen wurde der NanoDrop 2000c verwendet. Die Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des Extinktionsverhältnis  $A_{260/280}$  bestimmt, wobei hochreine Lösungen einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen. Durch zum Beispiel Proteine steigt die Extinktion bei 280 nm und vermindert den Quotienten (Gallagher und Desjardins, 2007). Pro RNA-Isolation konnten zwischen 0,1 und 0,4 µg RNA/µl gewonnen werden. Die  $A_{260/280}$ -Quotienten lagen zwischen 1,9 und 2,0.

Mit Hilfe des Bioanalyzers 2100 und dem Agilent RNA 6000 Nano Kit wurde die Intaktheit der RNA überprüft ([Abbildung 14 A+B und Abbildung 15](#)).



**Abbildung 14:** Messung der Integrität der RNA. Diese wurde mit Hilfe des RNA Nano Chips (A) und des Bioanalyzers 2100 (B) durchgeführt.

Als Maß für die Integrität gilt die RIN. Diese liegt bei völlig degradiertem RNA bei 1 und bei völlig intakter RNA bei 10 (Schroeder et al., 2006). Die RIN-Werte lagen bei den Proben zwischen 7,70 und 8,80.



**Abbildung 15:** Bestimmung der RNA-Qualität mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer 2100. Die Daten werden als Elektropherogramm (A) oder als gelähnliches Bild (B) dargestellt. Zusammenfassend kann die Untersuchung mit dem Bioanalyzer Daten zur RNA-Konzentration, dem 28S/18S-Verhältnis und der RIN liefern (C).

Anschließend wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

#### 2.2.4.3 Reverse Transkriptase-Reaktion

Vor der Reversen Transkriptase- Reaktion wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um zu vermeiden, dass eventuell die RNA durch genomische DNA kontaminiert wird.

##### Durchführung:

1. Langsames Auftauen der RNA auf Eis.
2. Verdünnen der RNA mit Hilfe von destilliertem RNase- und DNase-freien Wasser auf eine Konzentration von  $0,7\text{ }\mu\text{g RNA pro }7,5\text{ }\mu\text{l}$  und Auffüllen mit diesem auf ein Endvolumen von  $7,5\text{ }\mu\text{l}$  pro Probe.
3. Zugabe von:

- 1 µl 10xReaktionspuffer (100 mM Tris-HCL, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5)
  - 1,5 µl DNase I (1 U/µl)
4. Inkubation der Proben für 30 Minuten bei 37 °C zum Ablauf der Reaktion.
  5. Zugabe von 1 µl EDTA (50 mM) und Inkubation der Proben für zehn Minuten bei 65 °C zum Stoppen des Verdaus.
  6. Lagerung der Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

Zum Erreichen und Halten der verschiedenen Temperaturen wurden die Proben in den MJ Research PTC-200 Thermocycler gestellt.

In der Reversen Transkriptase-Reaktion wurde die RNA mit Hilfe eines Primers durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

#### Durchführung:

1. Langsames Auftauen der RNA auf Eis.
2. Hinzufügen von 1 µl Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer (0,5 µg/µl) zur RNA-Lösung als Startpunkt für die Reverse Transkriptase.
3. Auffüllen der Proben mit destilliertem RNase- und DNase-freien Wasser auf 13,7 µl.
4. Inkubation der Proben für fünf Minuten bei 65 °C und anschließend für zehn Minuten bei Raumtemperatur zur Bindung der Primer an die RNA.
5. Hinzufügen von:
  - 2 µl 10x AffinityScript RT-Puffer (500 mM Tris-HCL, pH 8,3, 750 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>)
  - 2 µl DTT (100 mM)
  - 0,8 µl dNTP-Mix (100 mM)
  - 1 µl AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase
  - 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)

Der Reaktionsansatz besitzt ein Endvolumen von 20 µl.

6. Inkubation des Ansatzes für eine Stunde bei 42 °C zur cDNA- Synthese.
7. Erhitzen auf 70 °C für 15 Minuten zur Denaturierung des Enzyms und zum Stoppen der Reaktion.

Die gesamte RT-Reaktion wurde mit Hilfe des MJ Research PTC-200 Thermocyclers durchgeführt.

#### **2.2.4.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)**

Im folgenden Schritt wurden spezifische Sequenzen der cDNA mit Hilfe einer Taq-DNA-Polymerase und spezifischen Primern amplifiziert. Durch einen in doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff kann die DNA detektiert werden. Um detektiert zu werden, muss die Fluoreszenz eine gewisse Stärke haben, um die Hintergrundfluoreszenz zu überdecken. Je weniger Zyklen in der PCR nötig sind, um diese Schwelle zu erreichen, desto größer war die Anzahl der DNA-Kopien zu Beginn der Reaktion (Higuchi et al., 1993). Der Zyklus, bei dem diese Schwelle erreicht ist wird threshold cycle (Ct) genannt.

##### Vorbereitungen:

1. Verdünnen der vorliegenden cDNA-Lösungen der Proben mit destilliertem RNase- und DNase-freien Wasser auf 1:10.
2. Verdünnen der Proben der Standardkurve mit destilliertem RNase- und DNase-freien Wasser auf 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320. Für die Proben der Standardkurven wurde je nach Primer cDNA einer Mäuse-Referenz-RNA oder ein Mix aus den verschiedenen cDNA der zu untersuchenden Proben benutzt.
3. Hinzufügen von 6 µl des 1:100 mit destilliertem RNase- und DNase-freien Wasser verdünnten ROX Reference dye zum 2xBrilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix.
4. Ansetzen der SYBR-Green-QPCR-Lösung:
  - 7,5 µl des angesetzten 2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green QPCR Master Mix (dieser enthält eine Taq-DNA-Polymerase, dNTPs,  $Mg^{2+}$ , einen Puffer



und einen in die doppelsträngige DNA-bindenden fluoreszierenden Farbstoff (SYBR Green I)

- 1 µl destilliertes RNase- und DNase-freies Wasser
- 1,5 µl des jeweiligen Primers

Pro Well werden 10 µl dieser Lösung benötigt.

#### Durchführung:

1. Pipettieren von jeweils 5 µl der cDNA der Proben und des Standards als Doppelbestimmungen auf eine 96-Loch-Platte innerhalb der UV Sterilizing PCR Workstation.
2. Pipettieren einer Probe von 5 µl destilliertem RNase- und DNase-freien Wassers als Negativkontrolle anstelle von cDNA in ein freies Well.
3. Pipettieren von jeweils 10 µl der SYBR-Green-QPCR-Lösung in jedes verwendete Well.
4. Verschließen der Platte mit Verschlussstreifen.
5. Zentrifugation der Platte mit Hilfe der Zentrifuge Perfect Spin P für eine Minute.
6. Transfer der Platte in den PCR-Block Mx3005P QPCR Systems und Starten des Amplifizierungsprogramms ([Tabelle 8](#)) mit Hilfe der MxPro QPCR Software.

|                               | Temperatur | Zeit  | Anzahl der Zyklen |
|-------------------------------|------------|-------|-------------------|
| <b>Initiale Denaturierung</b> | 95 °C      | 3 min | 1                 |
| <b>Denaturierung</b>          | 95 °C      | 10 s  | 40                |
| <b>Annealing/Elongation</b>   | 60 °C      | 20 s  |                   |
| <b>Schmelzkurvenanalyse</b>   | 95 °C      | 1 min | 1                 |
|                               | 55 °C      | 30 s  | } 20 min          |
|                               | bis        | ...   |                   |
|                               | 95 °C      | 30 s  |                   |

**Tabelle 8:** qRT-PCR: Übersicht des Amplifizierungsprogramms.

Nach Ablauf der Amplifikation wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die Proben von 55 °C alle 30 Sekunden um 1 °C erhitzt und so langsam bis auf

95 °C erhitzt. Durch die Hitze denaturieren die DNA-Doppelstränge bei einer spezifischen Temperatur in zwei Einzelstränge und es kommt zur Freisetzung des zuvor in die Doppelstränge interkalierten Farbstoffs und so zur Abnahme der Fluoreszenz. Da die Schmelzpunkte eventuell auftretender unspezifischer Amplifikationsprodukte oder Primerdimere bei Temperaturen unterhalb der Schmelzpunkte der spezifischen Amplifikationsprodukte liegen, können diese so von den erwünschten Produkten unterschieden werden.

## **2.2.5 Elektronenmikroskopie**

### **2.2.5.1 Übersicht**

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen müssen die in Ito-Fixans gelagerten Muskelproben zuerst in Epon eingebettet werden. Danach wird mit Hilfe von Semidünnschnitten und einem Lichtmikroskop Lage und Ausrichtung der Proben überprüft. Stimmen diese, werden Ultradünnschnitte angefertigt und diese kontrastiert. Im Anschluss an die Kontrastierung können die elektronenmikroskopischen Aufnahmen angefertigt werden.

### **2.2.5.2 Einbettung der Muskelproben**

Ansetzen der benötigten Substanzen und Reagenzien:

#### Lösung 1: 0,1 M Cacodylatpuffer

- Lösen von 42,8 g Dimethylarsinsäure Natriumsalz-Trihydrat (Kakodylsäure Natriumsalz) in 800 mL A. dest.
- Einstellen dieser Lösung mit 0,1 n HCL auf pH = 7,2-7,4.
- Auffüllen mit A. dest. auf ein Endvolumen von einem Liter.

#### Lösung 2: Ito-Fixans

- Zubereitung von 5 mL 25 % wässriges PFA.
- Hinzugeben von 10 mL einer 25 % Glutaraldehyd-Lösung.
- Hinzufügen von 0,05 g Pikrinsäure.

- Zugabe von etwas 0,1 M Cacodylatpuffer (Lösung 1).
- pH-Einstellung auf pH= 7,2-7,4 mit 0,1 n NaOH.
- Auffüllen mit 0,1 M Cacodylatpuffer (Lösung 1) auf 100 mL.

#### Lösung 3: Osmium

- Mischen von 3 % Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat zu gleichen Teilen mit 2 % wässrigem  $\text{OsO}_4$  unter einem Abzug.

#### Lösung 4: Epon C-Lösung

- Stammlösung A: Mischen von 62 mL Glycidether 100 (Epon 812) und 100 mL 2-Dodecenyln-Bernsteinsäureanhydrid (Glycidether-Härter DBA).
- Stammlösung B: Zusammengeben von 100 mL Glycidether 100 und 89 mL Methylnadicanhydrid (Glycidether-Härter MNA).
- Zusammenfügen von 5 mL der Stammlösung A und 5 mL der Stammlösung B.
- Hinzufügen von 0,15 mL 2,4,6-Tri-(dimethylaminomethyl)phenol (Beschleuniger).

#### Durchführung:

1. Entnahme der Proben aus dem Ito-Fixans (Lösung 2) und dreimaliges Spülen für jeweils fünf Minuten in 0,1 M Cacodylatpuffer (Lösung 1).
2. Zur Osmierung Eintauchen der Proben für eine Stunde in  $\text{OsO}_4$  (Lösung 3).
3. Spülen in 0,1 M Cacodylatpuffer (Lösung 1) für dreimal fünf Minuten.
4. Entwässerung in unvergälltem Ethanol in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 96 %, jeweils mindestens fünf Minuten und zuletzt viermal 100 % für jeweils 15 Minuten).
5. Eintauchen der Proben in Propylenoxid für zweimal zehn Minuten zur Infiltration.
6. Einsenken der Proben in eine Lösung aus Propylenoxid/Epon C (Lösung 4) im Verhältnis 1:1 über Nacht.

7. Einbringen der Proben am nächsten Morgen in die Epon-C-Lösung (Lösung 4) über Nacht.
8. Einbettung der Muskelproben am darauffolgenden Tag mit Hilfe der Epon-C-Lösung (Lösung 4) in Gelatinekapseln.
9. Aushärtung für mindestens zwölf Stunden bei 60 °C in einem Brutschrank.

### **2.2.5.3 Anfertigung der Ultradünnschnitte, Kontrastierung und Bildaufnahme**

Vor der Anfertigung der Ultradünnschnitte wurde zuerst die richtige Ausrichtung und Lage der Muskelproben überprüft.

#### Ansetzen der benötigten Substanzen und Reagenzien:

##### Lösung 1: Semidünnschnitt-Farblösung

- Mischen von 4 Teilen 1 % Toluidinblau O in 1 % wässrigem di-Natriumtetraborat-Decahydrat mit 1 Teil 1 % wässrigem Pyronin G.

##### Lösung 2: 4 % Uranylacetat

- Herstellen einer 4 % wässrigen Uranylacetat-Dihydrat-Lösung.

##### Lösung 3: Bleicitrat nach Reynolds

- Lösen von 2,66 g Blei(II)-nitrat und 3,52 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 60 mL Ampuwa.
- Kräftiges Schütteln der Lösung für eine Minute und Inkubation für 30 Minuten.
- Klären der Lösung mit circa 8 mL 1 n NaOH und Auffüllen der Lösung mit Ampuwa auf ein Endvolumen von 100 mL.

#### Durchführung der Lagekontrolle:

1. Herstellung von Glasmessern aus Glass strips mit dem KMR3 Glass Knifemaker.
2. Anfertigung von 1 µm dicken Semidünnschnitten.
3. Anfärbung der Semidünnschnitte mit der Semidünnschnitt-Farblösung (Lösung 1).

4. Überprüfen des Anschnitts sowie der richtigen Lage und Ausrichtung der Präparate mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

Durchführung der Anfertigung der Ultradünnschnitte, der Kontrastierung und der Aufnahme der Bilder:

1. Anfertigung von circa 50 nm dicken Ultradünnschnitten mit Hilfe eines Ultramikrotoms und Diamantmessers.
2. Aufziehen der Ultradünnschnitte auf Netzträger.
3. Zur Kontrastierung Setzen der Netzträger in einen Tropfen 4 % Uranylacetat (Lösung 2) für 15 Minuten.
4. Dreimaliges Waschen der Netzträger in jeweils einem Tropfen A. dest.
5. Eintauchen der Ultradünnschnitte in einen Tropfen Bleicitrat nach Reynolds (Lösung 3) für zehn Minuten.
6. Dreimaliges Spülen in einem Tropfen A. dest.
7. Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen mit Hilfe des Elektronenmikroskops Zeiss EM 10 C in der Vergrößerung 10.000x und 20.000x.

## **2.2.6 Auswertungen**

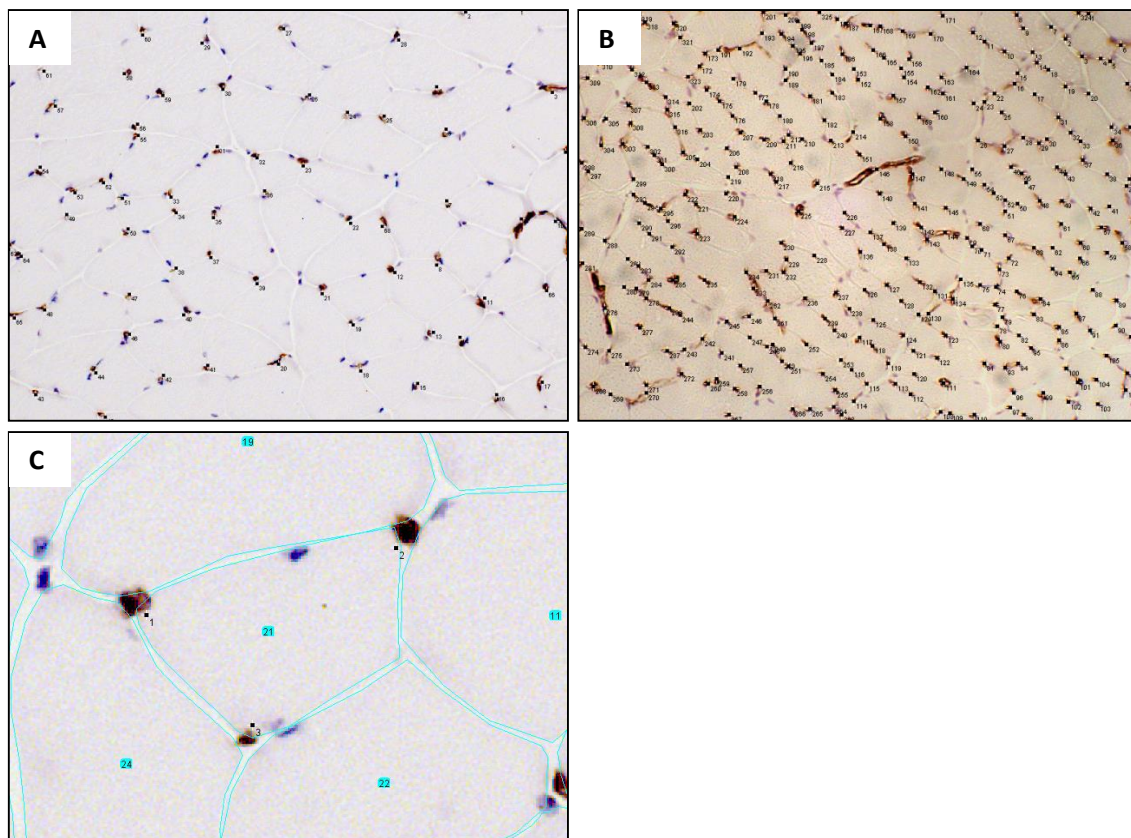
### **2.2.6.1 Färbungen**

#### **Kapillarfärbung mit Lectin von *Bandeiraea simplicifolia* (Isolectin B<sub>4</sub>)**

Um den Einfluss des ICS auf die Kapillarisierung des M. gastrocnemius und des M. soleus zu untersuchen wurde diese mittels BSI-B<sub>4</sub>-Lectin-Färbung untersucht. Als Kapillaren wurden alle Gefäße mit einem Lumendurchmesser von  $\leq 5 \mu\text{m}$  gewertet. Die Gefäße mit einem größeren Lumendurchmesser wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt, da deren Anzahl für eine statistische Auswertung zu gering war. Zur Untersuchung der Kapillarisierung wurde zum einen die Anzahl der Kapillaren pro  $\text{mm}^2$  ([Abbildung 16 A und B](#)) und zum anderen die Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser quantifiziert ([Abbildung 16 C](#)). Neben der Kapillarisierung war von

Interesse, ob ICS Einfluss auf die mittlere Faserquerschnittsfläche hat. Dazu wurde jede Muskelfaser in einer definierten Fläche umrandet und so deren Querschnittsfläche ermittelt. Pro Maus wurden jeweils mindestens 100 Muskelfasern umrandet ([Abbildung 18 A und C](#)). Dieses Kriterium ist bereits in der Literatur beschrieben (Weber et al., 2007). Neben der mittleren Faserquerschnittsfläche wurde auch die mittlere Faseranzahl pro mm bestimmt.

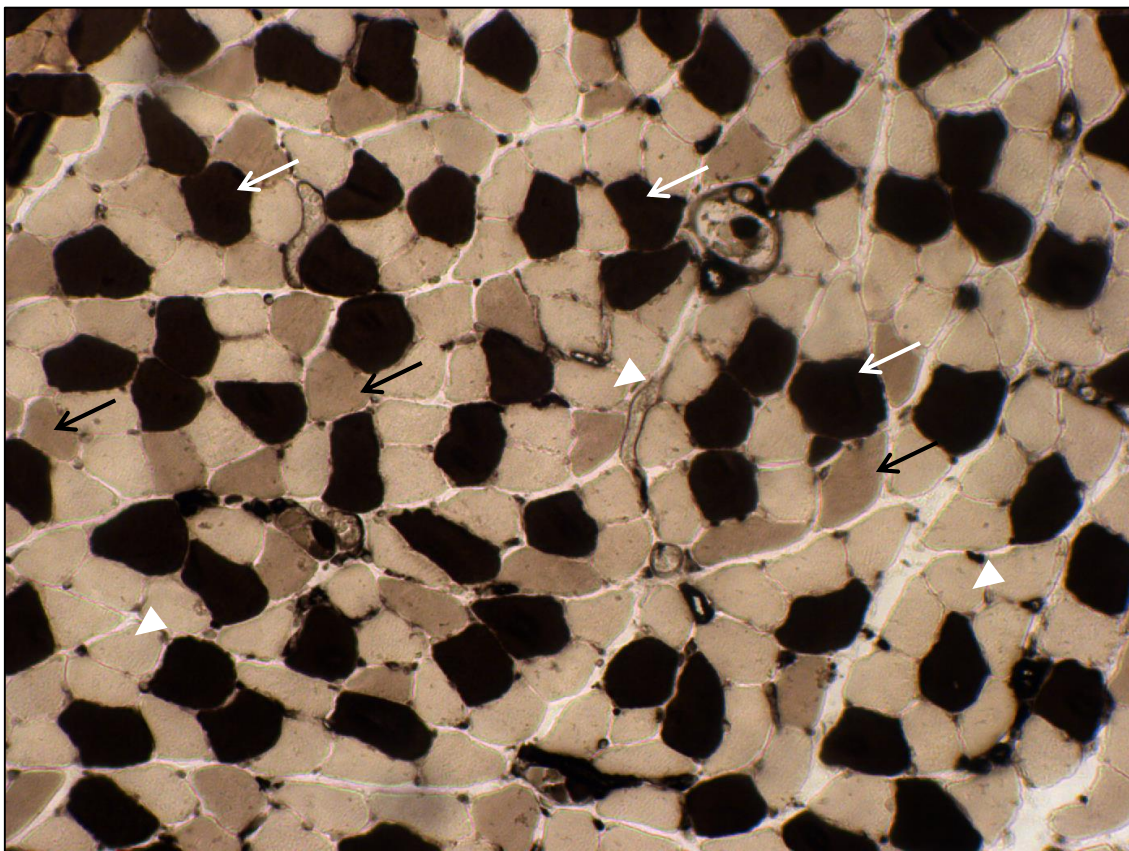
Die Bilder wurden in der Vergrößerung x200 mit dem Mikroskop BH-2 aufgenommen und mit Hilfe des Programms Image J 1.45s ausgewertet.



**Abbildung 16:** Beispielbilder zur Auswertung der Kapillarisation in der BSI-B<sub>4</sub>-Lectin-Färbung. (A): Kapillaranzahl pro Fläche im M. gastrocnemius. (B): Kapillaranzahl pro Fläche im M. soleus. (C): Darstellung der Auswertung der Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius. Die Muskelfaser mit der Nummer 21 hat zum Beispiel Kontakt zu drei Kapillaren. Zoom in die Abbildung 18(A). Originalvergrößerung: x200.

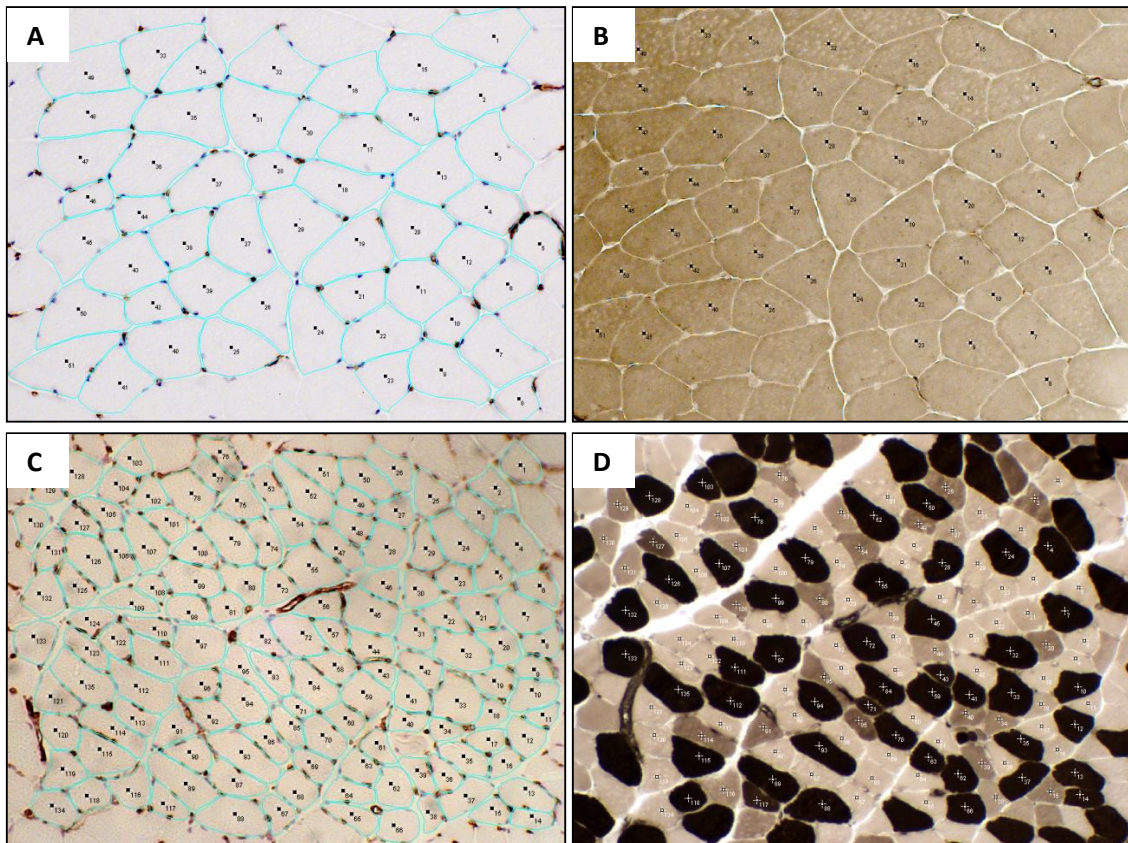
### ATPase-Färbung

Neben der mittleren Faserfläche und der mittleren Faseranzahl wurde auch die Fasertypkomposition im M. gastrocnemius und M. soleus untersucht. Es wurden die Fasertypen I, IIa und IIx unterschieden ([Abbildung 17](#)). Dann wurde der Anteil der verschiedenen Fasertypen in Prozent an der ausgewerteten Gesamtfaseranzahl ermittelt. Jede einzelne in der BSI-B<sub>4</sub>-Lectin-Färbung umrandete Muskelfaser konnte der entsprechenden Muskelfaser in der ATPase-Färbung zugeordnet werden ([Abbildung 18](#)). Aufgenommen wurden die Bilder mit dem Mikroskop BH-2 in der Vergrößerung x200.



**Abbildung 17:** Darstellung der verschiedenen Muskelfasertypen im M. soleus mittels ATPase-Färbung. Fasertyp I (weiße Pfeile), Fasertyp IIa (weiße Pfeilspitzen), Fasertyp IIx (schwarze Pfeile). Originalvergrößerung: x200.





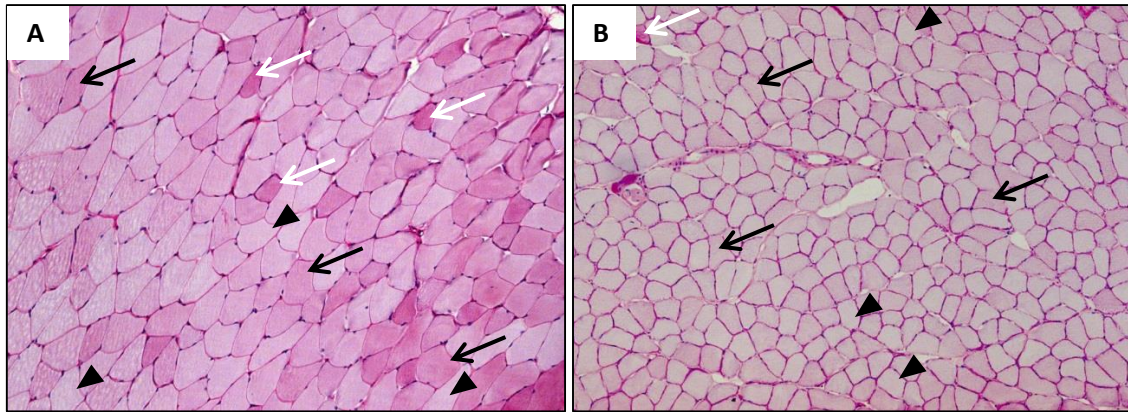
**Abbildung 18:** Beispiel der Zuordnung der BSI-B<sub>4</sub>-Lectin-Färbung zur ATPase-Färbung im M. gastrocnemius und im M. soleus. Messung der mittleren Muskelfaserquerschnittsfläche im M. gastrocnemius (A) und im M. soleus (C). (B + D): Jeder in der Lectin-Färbung umrandeten Muskelfaser konnte die entsprechende Faser in der ATPase-Färbung zugeordnet und so deren Fasertyp bestimmt werden. Originalvergrößerung: x200.

### Periodsäure-Schiff-Reaktion-Färbung

Um den Glykogengehalt der Muskelfasern zu bestimmen wurde die PAS-Färbung verwendet. Die Muskelfasern im M. gastrocnemius und M. soleus wurden nach der Färbeintensität in ungefärbt/hell, mittel und dunkel eingeteilt ([Abbildung 19](#)). Danach wurde der mittlere Anteil der jeweiligen Faserart an der ausgewerteten Gesamtfaseranzahl in Prozent berechnet. Diese Art der Auswertung ist bereits in der Literatur beschrieben, hier wurden jedoch die Färbeintensitäten dunkel, mittel, hell, sehr hell und negativ unterschieden (Coyle et al., 1986).

Die Bilder wurden in der Vergrößerung x100 mit dem Mikroskop Axio Imager M2 aufgenommen und mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J 1.45s ausgewertet.



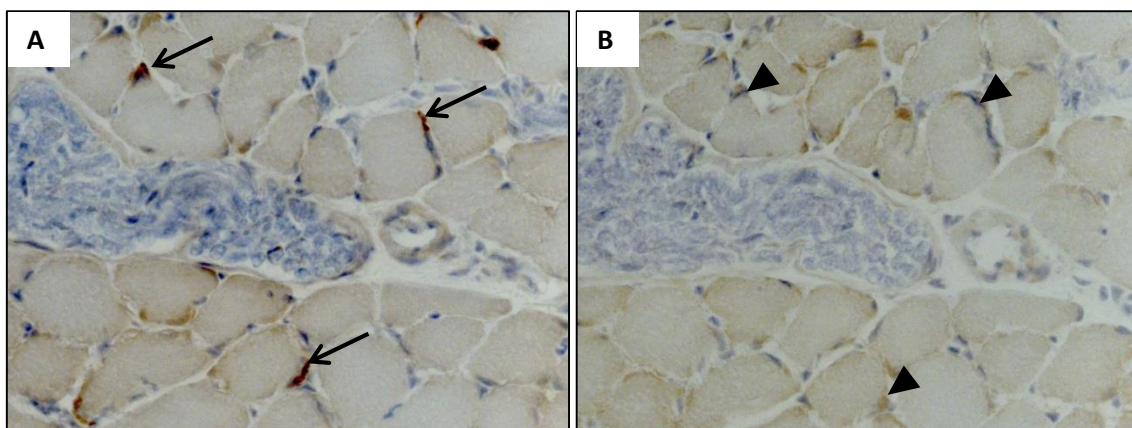


**Abbildung 19:** Einteilung der Fasern bezüglich des Glykogengehalts anhand der Intensität in der PAS-Färbung. Dunkle Fasern (weiße Pfeile), mittlere Fasern (schwarze Pfeile), ungefärbte/helle Fasern (schwarze Pfeilspitzen). (A): M. gastrocnemius. (B): M. soleus. Originalvergrößerung: x100.

### $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung

Zur Untersuchung der Anzahl motorischer Endplatten pro Muskelfaser im M. gastrocnemius und im M. soleus wurden nikotinerge Acetylcholinrezeptoren mittels  $\alpha$ -Bungarotoxin angefärbt ([Abbildung 20](#)). Die Anzahl an Muskelfasern und die Anzahl von motorischen Endplatten pro Bild wurde ermittelt und so die mittlere Anzahl motorischer Endplatten pro Muskelfaser berechnet.

Die Bilder wurden mit dem Mikroskop Axio Imager M2 in der Vergrößerung x100 angefertigt und mit dem Programm Image J 1.45s ausgewertet.



**Abbildung 20:** Beispiele der  $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung. (A): Darstellung der Färbung nach Inkubation des Gewebeschnittes mit  $\alpha$ -Bungarotoxin über Nacht. Man erkennt angefärbte motorische Endplatten (schwarze Pfeile). (B): Darstellung der Färbung des Nachbarschnittes nach Inkubation mit PBS anstelle von  $\alpha$ -Bungarotoxin über Nacht (Negativ-Kontrolle). Die motorischen Endplatten wurden im Vergleich zu (A) nicht angefärbt (schwarze Pfeilspitzen). Originalvergrößerung: x400.

## **Immunhistochemie**

Immunhistochemische Untersuchungen wurden mittels Einfachfärbungen unter Verwendung der Primärantikörper anti-CD68, anti-Fbxo32, anti-IL-1 $\beta$ , anti-MIF und anti-MuRF1 durchgeführt.

Zur Auswertung der Bilder wurde die mittlere Anzahl positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> berechnet.

Es wurden ferner die mittlere Anzahl COX-2<sup>+</sup>-Zellen pro mm<sup>2</sup> (Glattmuskelzellen in Gefäßen ausgenommen) wie auch der Anteil COX-2-Kapillaren an der Gesamtkapillaranzahl in % im M. gastrocnemius und im M. soleus auf dem selben Muskelschnitt ermittelt. Hierzu wurden anti-COX-2-Primärantikörper zusammen mit biotinyliertem BSI-Lectin auf einem Muskelschnitt verwendet. Das biotinylierte BSI-Lectin wurde anschließend mit Hilfe von Cy2-konjugiertem Streptavidin sichtbar gemacht und so die Gefäße visualisiert. Zuerst wurde die mittlere Anzahl COX-2<sup>+</sup>-Zellen (Glattmuskelzellen in Gefäßen ausgenommen) pro mm<sup>2</sup> ermittelt. Hierzu wurde ein Bild der COX-2-Färbung über das entsprechende BSI-Lectin-Bild gelegt und nur die COX-2<sup>+</sup>-Zellen gezählt, die Lectin-negativ waren. Danach wurde die Anzahl der COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren in Prozent an der Gesamtkapillaranzahl ermittelt, indem zuerst alle Kapillaren gezählt wurden und anschließend untersucht wurde, welche von diesen Kapillaren COX-2<sup>+</sup> sind.

Die Bilder der immunhistochemischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des Mikroskops Axio Imager M2 in der Vergrößerung x200 aufgenommen und anschließend mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J 1.45s analysiert.

Zur Überprüfung der Co-Lokalisation von COX-2 und Gefäßen wurde eine Doppelfärbung mit anti-COX-2-Antikörpern und biotinyliertem Lectin exemplarisch angefertigt. Die COX-2-Reaktion wurde mittels Cy3-konjugierter Affe anti-Kaninchen COX-2-Antikörper sichtbar gemacht. Anschließend wurden Aufnahmen mit Hilfe des FluoView FV1000 Konfokalmikroskop in der Vergrößerung x630 angefertigt ([Anhang C-10](#)).

### 2.2.6.2 Molekularbiologische Analyse der Muskelbiopsieproben

Die relative Quantifizierung der molekularbiologischen Daten erfolgte durch Anwendung der relativen Standardkurven-Methode. Für jedes zu untersuchende Gen wurde mit Hilfe eines cDNA-Mix der zu untersuchenden Proben oder cDNA einer Mäuse-Referenz-RNA eine Standardkurve erstellt, um so mit Hilfe linearer Regression Rückschlüsse auf die cDNA-Konzentration in den zu untersuchenden Proben zu erhalten.

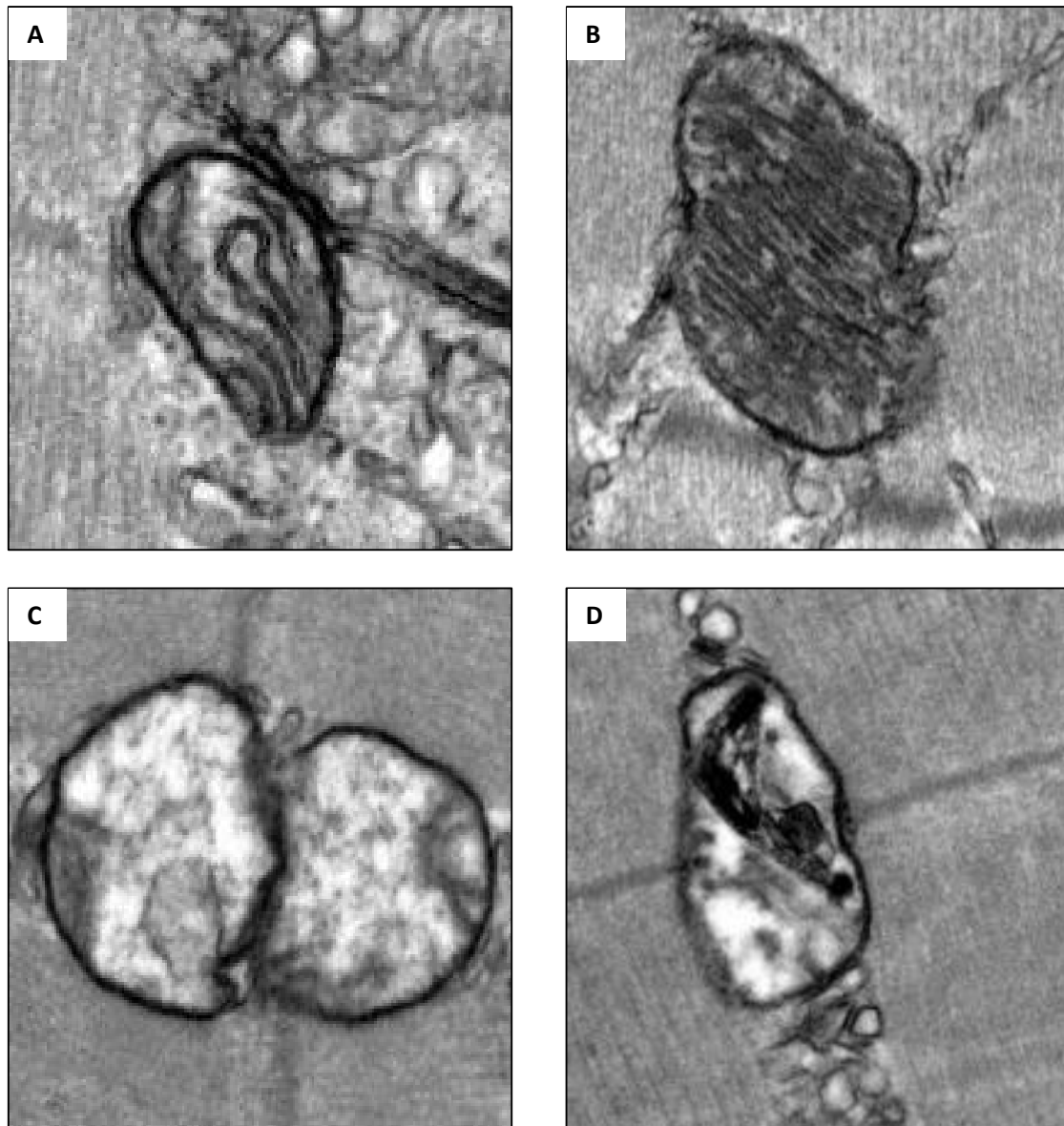
Zur Normalisierung der cDNA wurde die Expression der jeweiligen Ziel-DNA auf das konstitutiv exprimierte „house-keeping“ Gen Tbp bezogen.

Das „house-keeping“ Gen (~ interne Kontrolle) wurde zuvor mit Hilfe des Programms NormFinder.xla (Andersen et al., 2004) aus verschiedenen getesteten „house-keeping“ Genen wie bereits beschrieben (Stern-Straeter et al., 2009) ausgewählt. Die anderen getesteten „house-keeping“ Gene waren: Rpl32, Gapdh und Actb.

### 2.2.6.3 Elektronenmikroskopie

Um Anzahl und Größe der Mitochondrien im M. gastrocnemius und M. soleus pro Fläche zu ermitteln wurden mittels Zeiss EM 10 C Elektronenmikroskop Bilder in der Vergrößerung x10.000 von jeweils fünf Tieren aus jeder Gruppe verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass keine Zellkerne im Bild lagen und nur intrafibrilläre Mitochondrien ausgewertet wurden. Zur Auswertung wurde mittels Image J 1.45s die Anzahl der Mitochondrien pro Fläche gezählt und die Mitochondrien in dieser Fläche umrandet, um die mittlere Querschnittsfläche pro Mitochondrium zu ermitteln.

Um die Morphologie der Mitochondrien zu bewerten, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen in der Vergrößerung x20.000 ausgewertet. Die Mitochondrien pro Fläche wurden gezählt und morphologisch entweder als „intakt“ oder „defekt“ bewertet ([Abbildung 21](#)). Als „intakt“ wurde ein Mitochondrium gewertet, dessen Cristae zu  $\geq 50$  % intakt waren. Mitochondrien, die dieses Kriterium nicht erfüllten, wurden als „defekt“ gewertet. So wurde der mittlere Anteil intakter und defekter Mitochondrien in Prozent an der Gesamtmitochondrienanzahl ermittelt.



**Abbildung 21:** Morphologische Einteilung der Mitochondrien. (A) + (B): Beispiele für intakte Mitochondrien mit gut sichtbaren Cristae. (C) + (D): Beispiele für defekte Mitochondrien. Originalvergrößerung: x20.000 (Bonaterra et al., 2016).

#### 2.2.6.4 Statistische Analyse, Berechnung und Visualisierung der Ergebnisse

Die Resultate der Färbungen und der molekularbiologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden unter Verwendung von Microsoft Excel 2010 berechnet. Die statistische Analyse der Färbungen und der elektronenmikroskopischen Proben wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Sigma Plot 12.0 mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests und des t-Tests durchgeführt.

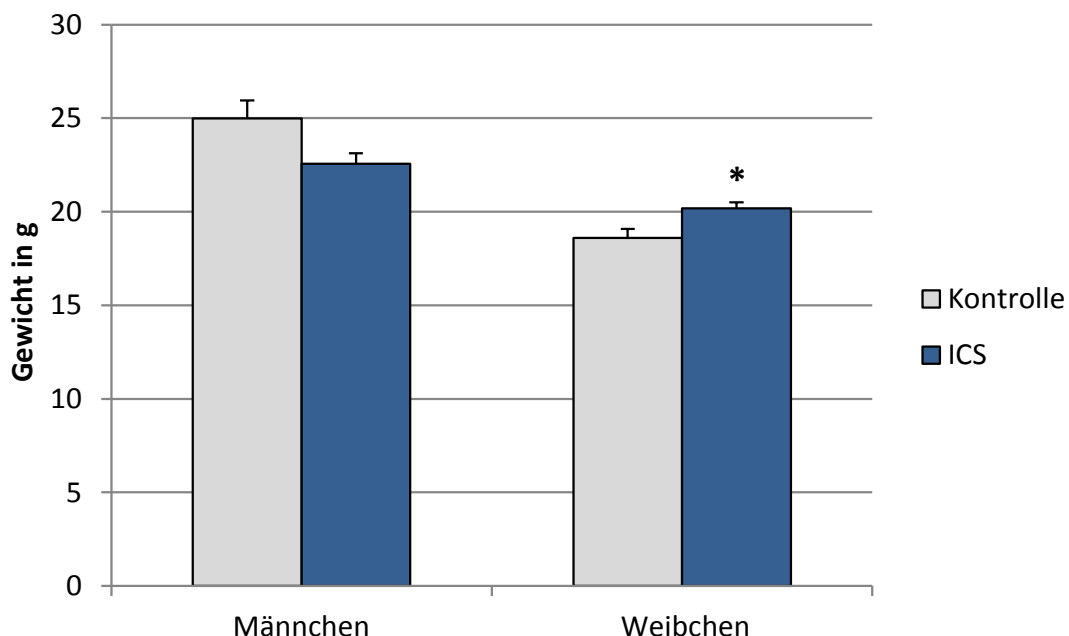
Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Anschließend erfolgte die grafische Darstellung der Ergebnisse mittels Microsoft Excel 2010.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gewicht der Mäuse

Zuerst wurde der Einfluss von ICS auf das Gewicht der Mäuse untersucht. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

Während sich bei männlichen ICS-Tieren keine signifikante Änderung des mittleren Körpergewichts ( $22,6 \pm 0,6$  [g]) gegenüber Kontrolltieren ( $25,0 \pm 1,0$  [g]) zeigte, lag das Körpergewicht weiblicher ICS-Tiere ( $20,2 \pm 0,3$  [g]) signifikant ( $P = 0,012$ ) um 8,6 % höher als bei weiblichen Kontrolltieren ( $18,6 \pm 0,5$  [g]) ([Abbildung 22](#)).



**Abbildung 22:** Tiergewicht. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9. \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle.

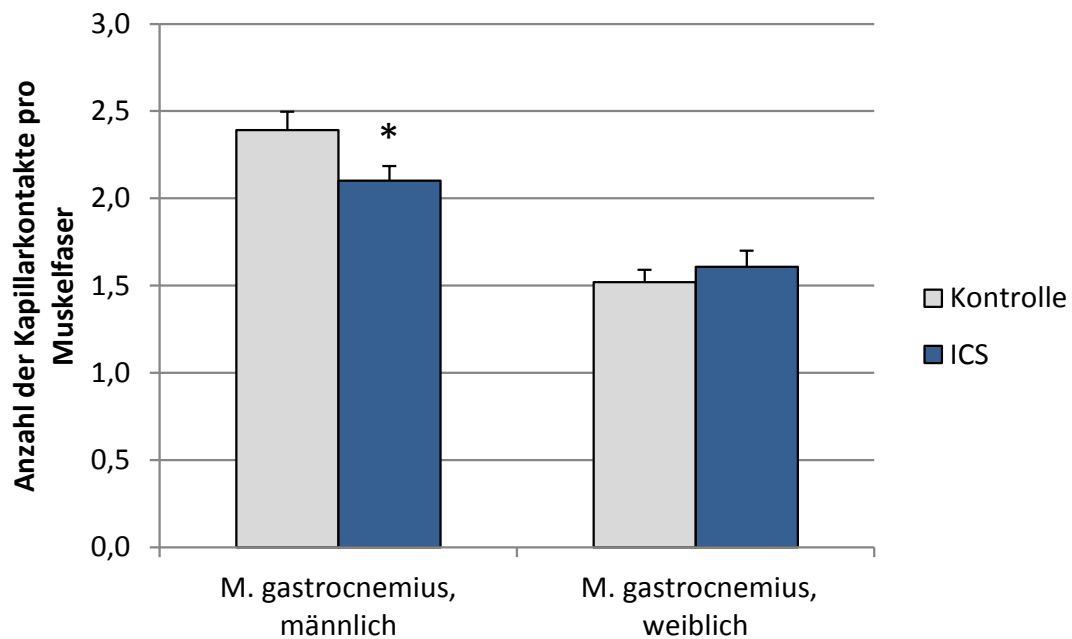
#### 3.2 Ergebnisse der Untersuchungen des M. gastrocnemius

##### 3.2.1 Untersuchung der Kapillarisation und Angiogenese

Um den Einfluss des ICS auf die Kapillarisation der Muskulatur zu untersuchen, wurden die Kapillaren (Endothelzellen) anhand der BSI-B<sub>4</sub>-Lectin-Färbung identifiziert.

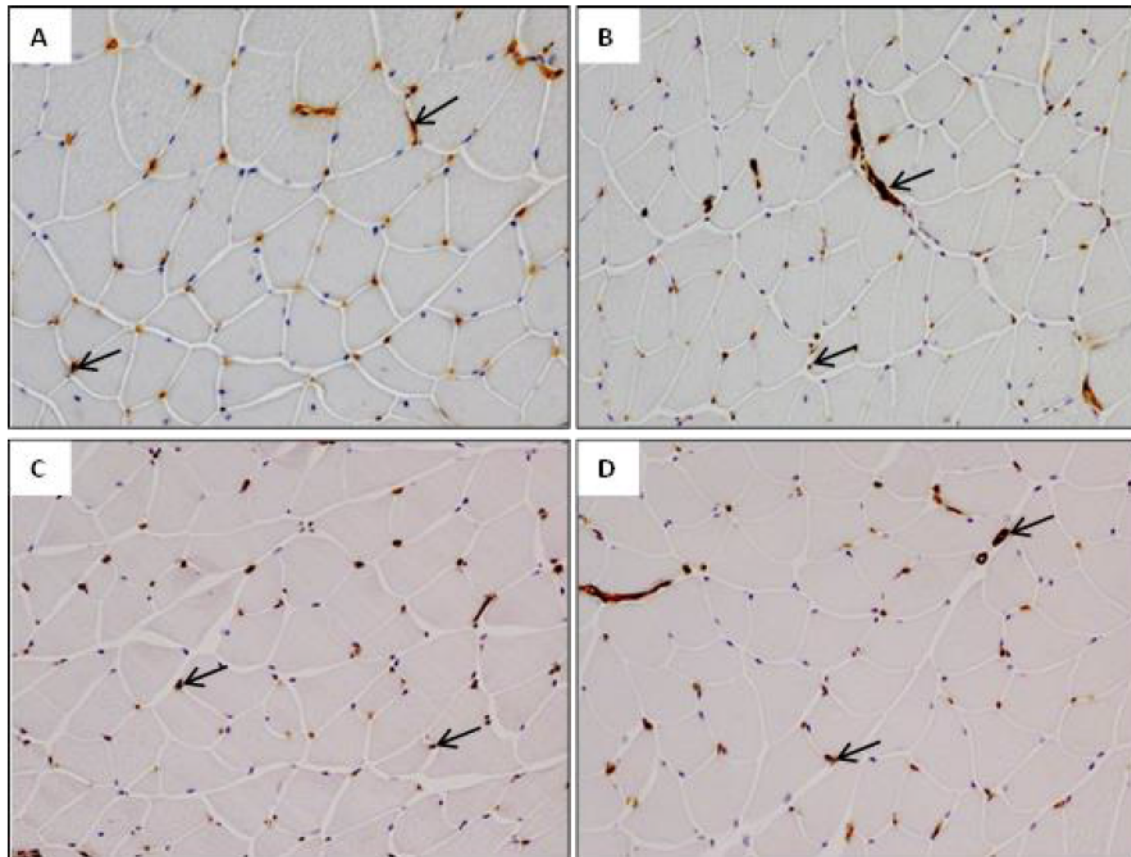
Die mittlere Anzahl der Kapillaren pro mm<sup>2</sup> im M. gastrocnemius war weder bei männlichen noch bei weiblichen ICS-Tieren gegenüber männlichen bzw. weiblichen Kontrolltieren signifikant verändert ([Anhang B-1 und Abbildung 24](#)). Hingegen war die

mittlere Anzahl von Kapillarkontakten pro Muskelfaser bei männlichen ICS-Mäusen ( $2,1 \pm 0,1$  [n/Muskelfaser]) verglichen mit den Kontrollen ( $2,4 \pm 0,1$  [n/Muskelfaser]) signifikant ( $P = 0,044$ ) um 12,5 % verringert. Bei weiblichen ICS-Mäusen ( $1,6 \pm 0,1$  [n/Muskelfaser]) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe ( $1,5 \pm 0,1$  [n/Muskelfaser]) ([Abbildung 23](#)).



**Abbildung 23:** Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle. Kontrolle männlich:  $n=9$ , ICS männlich:  $n=9$ , Kontrolle weiblich:  $n=8$ , ICS weiblich:  $n=9$  (Bonaterra et al., 2016).



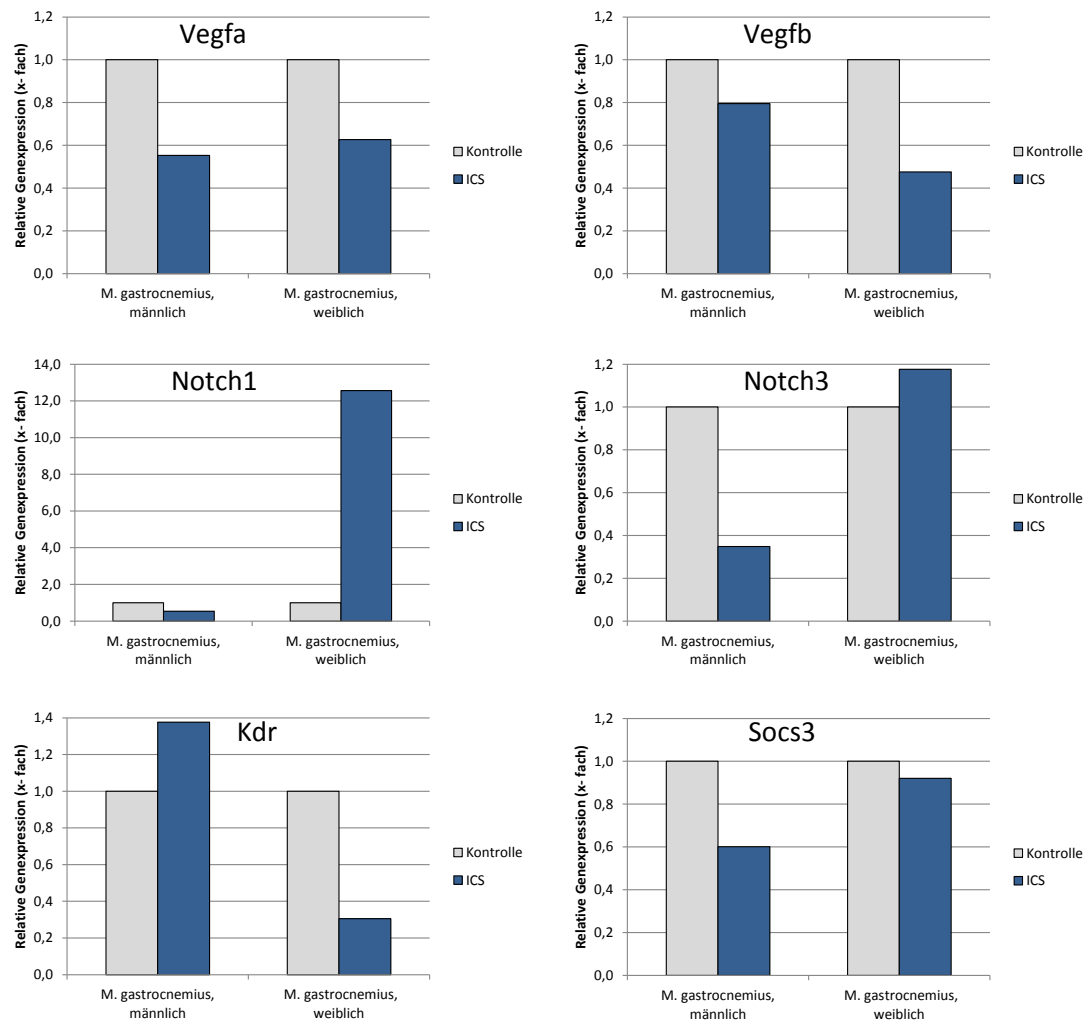


**Abbildung 24:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach BSI-B<sub>4</sub>-Lectin-Färbung. Darstellung der Kapillaren (schwarze Pfeile). (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D) Weibliche ICS-Maus. Originalvergrößerung: x200 (Bonaterra et al., 2016).

Neben den histologischen Untersuchungen der Kapillarisation wurden auch Angiogenesemarker mittels qRT-PCR bestimmt. Hierzu wurden die relativen Expressionen der Vegfa-, Vegfb-, Notch1-, Notch3-, Kdr- (auch VEGFR-2 genannt) und Socs3-Gene analysiert/quantifiziert. Die relative Expression des Vegfa-Gens war sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen ICS-Tieren um 40 % niedriger als bei Kontrolltieren ([Abbildung 25](#)). Ähnlich war auch die relative Expression des Vegfb-Gens bei ICS-Männchen um 20 % und bei ICS-Weibchen um 50 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert ([Abbildung 25](#)).

Auch die Expression des Notch1-Gens war bei ICS-Männchen gegenüber der Kontrolle um 50 % reduziert, die Expression des Notch3-Gens gar um 60 % ([Abbildung 25](#)). ICS-Weibchen zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine um 1160 % höhere Notch1-Genexpression, sowie eine um 20 % höhere Notch3-Genexpression ([Abbildung 25](#)). Die Kdr-Genexpression war bei weiblichen ICS-Mäusen um 70 % niedriger als bei der Kontrolle, wohingegen bei ICS-Männchen eine um 40 % höhere Expression als bei der

Kontrolle gefunden wurde ([Abbildung 25](#)). Die Expression des Socs3-Gens war bei ICS-Weibchen um 10 % und bei männlichen ICS-Mäusen um 40 % niedriger als bei der Kontrolle ([Abbildung 25](#)).



**Abbildung 25:** Relative Expression (qRT-PCR) von Angiogenese-Genen im M. gastrocnemius von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

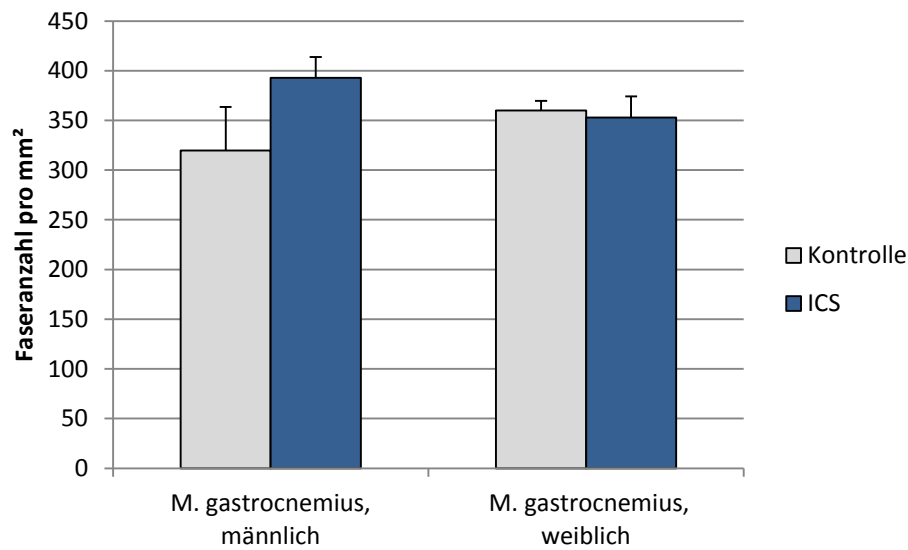
### 3.2.2 Bestimmung der mittleren Faserdichte, der mittleren Faserfläche und der Fasertypkomposition

Neben der Kapillarisierung wurden im M. gastrocnemius die mittlere Faserdichte, die mittlere Muskelfaserquerschnittsfläche und die Fasertypkomposition untersucht.

Während die mittlere Faserdichte (Fasergesamtzahl/mm<sup>2</sup>) im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere (392,9 + 20,9 [n/mm<sup>2</sup>]) gegenüber männlichen Kontrolltieren (319,6 + 44,0 [n/mm<sup>2</sup>]) nicht-signifikant (P = 0,174) um 22,9 % höher lag, war diese bei

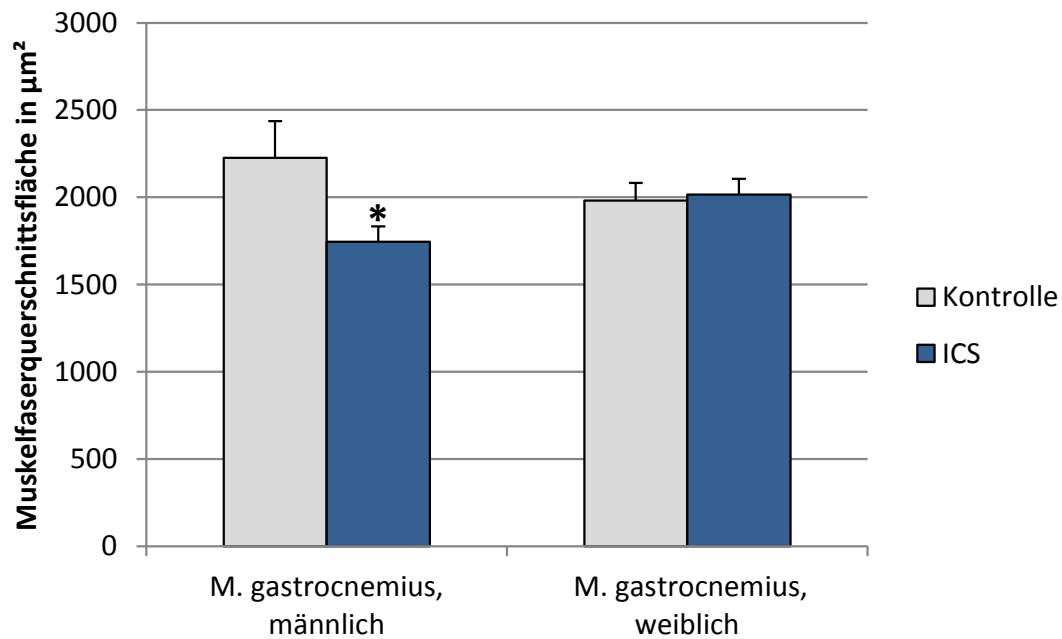


weiblichen ICS-Tieren ( $353,0 \pm 21,1$  [n/mm<sup>2</sup>]) im Vergleich zu Kontrolltieren ( $360,0 \pm 9,8$  [n/mm<sup>2</sup>]) ähnlich ([Abbildung 26](#)).



**Abbildung 26:** Faserdichte (n/mm<sup>2</sup>) im M. gastrocnemius. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016).

Die mittlere Muskelfaserquerschnittsfläche (in  $\mu\text{m}^2$ ) im M. gastrocnemius war bei weiblichen ICS-Tieren ( $2015,4 \pm 89,8$  [ $\mu\text{m}^2$ ]) gegenüber Kontrolltieren ( $1981,4 \pm 99,8$  [ $\mu\text{m}^2$ ]) nicht-signifikant unterschiedlich, wohingegen bei männlichen ICS-Mäusen die Muskelfaserquerschnittsfläche ( $1.745,6 \pm 87,7$  [ $\mu\text{m}^2$ ]) im Vergleich zu männlichen Kontrolltieren ( $2.226,2 \pm 209,5$  [ $\mu\text{m}^2$ ]) signifikant ( $P = 0,05$ ) um 21,6 % kleiner war ([Abbildung 27](#)).



**Abbildung 27:** Muskelfaserquerschnittsfläche (in  $\mu\text{m}^2$ ) im M. gastrocnemius. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle. Kontrolle männlich:  $n=9$ , ICS männlich:  $n=9$ , Kontrolle weiblich:  $n=8$ , ICS weiblich:  $n=9$  (Bonaterra et al., 2016).

In der Fasertypkomposition (Anteil der verschiedenen Muskelfasertypen an der Gesamtfaseranzahl in %) gab es in beiden Geschlechtern keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Sowohl bei Kontrollmäusen als auch bei männlichen und weiblichen ICS-Tieren existierten nur Fasern vom Typ IIx ([Anhang B-2](#)).

### 3.2.3 Ergebnisse der PAS-Färbung

Um den Glykogengehalt der Muskelfasern zu bestimmen wurden diese mittels PAS-Methode angefärbt. Weder bei männlichen noch bei weiblichen ICS-Tieren fand sich ein signifikanter Unterschied des intramuskulär gespeicherten Glykogens gegenüber korrespondierender Kontrolle ([Anhang B-3 A + B und Anhang B-4](#)).

### 3.2.4 Wirkung von ICS auf inflammatorische Parameter

#### 3.2.4.1 IL-1 $\beta$

Ausgehend vom FMS-Mausmodell lag es nahe, den Einfluss von ICS auf inflammatorische Parameter in der Muskulatur der Tiere zu untersuchen. Hierzu wurden zum einen auf Muskelquerschnitten immunhistochemische Färbungen mit

anti-IL-1 $\beta$ -, anti-COX-2-, anti-MIF- und anti-CD68-Antikörpern angefertigt. Zum anderen wurde mit Hilfe molekularbiologischer Methoden die relative Expression der IL-1 $\beta$ -, COX-2-, MIF-, CD68-, IL-6- und TNF-Gene gemessen.

In der qRT-PCR zeigte sich bei männlichen ICS-Tieren eine um 30 % erniedrigte und bei weiblichen ICS-Tieren eine um 50 % erhöhte Expression des IL-1 $\beta$ -Gens im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ([Anhang B-6 B](#)). In der immunhistochemischen Färbung mit anti-IL-1 $\beta$ -Antikörpern wurde die Dichte an IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen bestimmt ([Anhang B-5](#)).

Die Dichte an IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen war weder bei männlichen noch bei weiblichen ICS-Tieren (1153,6 + 71,5 bzw. 1024,3 + 58,8 [n/mm<sup>2</sup>]) gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe (1104,7 + 57,0 bzw. 935,1 + 30,8 [n/mm<sup>2</sup>]) signifikant verschieden ([Anhang B-6 A](#)).

#### **3.2.4.2 Cyclooxygenase 2**

Bei der relativen Expression des COX-2 Gens existierte im Mittel bei männlichen und weiblichen ICS-Tieren kein signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ([Anhang B-8 C](#)).

Die Untersuchung der COX-2<sup>+</sup>-Zellen erfolgte mittels anti-COX-2-Antikörpern als Doppelfärbung mit biotinyliertem BSI-Lectin zur gleichzeitigen Identifizierung von Kapillaren ([Anhang B-7](#)).

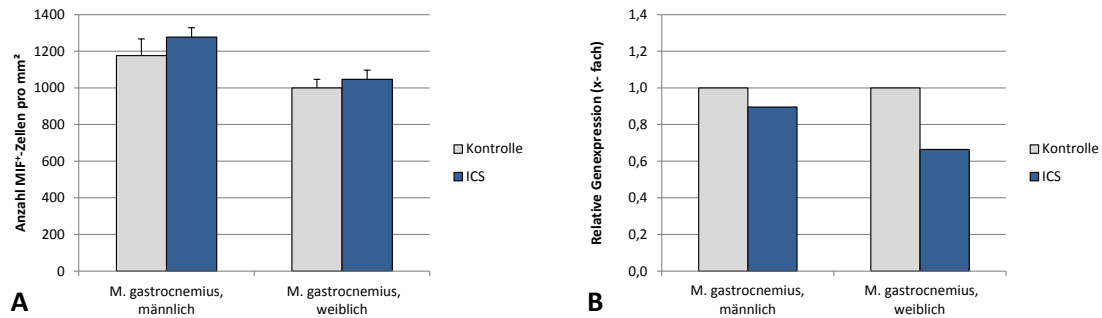
Sowohl die mittlere Anzahl COX-2<sup>+</sup>-Zellen (COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren ausgenommen) als auch der Anteil COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren in Relation zur Gesamtkapillaranzahl (in %) waren zwischen männlichen/weiblichen ICS- und Kontrolltieren ähnlich ([Anhang B-8 A + B](#)).

#### **3.2.4.3 MIF**

Die MIF-Expression wurde mittels immunhistochemischer ([Anhang B-9](#)) und molekularbiologischer Methoden untersucht.

Die mittels qRT-PCR gemessene relative Expression des MIF-Gens war im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere um 10 % und bei weiblichen ICS-Tieren um 30 % gegenüber der jeweiligen Kontrolle vermindert ([Abbildung 28 B](#)).

Die Dichte an MIF<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>) war im M. gastrocnemius männlicher ICS-Mäuse (1277,3 + 50,8 [n/mm<sup>2</sup>]) um 8,6 % höher (P = 0,296) als bei der Kontrolle (1176,4 + 91,0 [n/mm<sup>2</sup>]). Bei weiblichen ICS-Tieren war im M. gastrocnemius die Dichte an MIF<sup>+</sup>-Zellen im Mittel wie bei Kontrolltieren ([Abbildung 28 A](#))



**Abbildung 28:** MIF-Expression im M. gastrocnemius. (A): Dichte MIF<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016). (B): Relative Expression (qRT-PCR) des MIF-Gens von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

### 3.2.4.4 CD68

Zur Identifizierung von Makrophagen wurden anti-CD68-Antikörper verwendet ([Anhang B-10](#)). Weiterhin wurde auch die relative Genexpression des CD68-Gens mittels qRT-PCR untersucht.

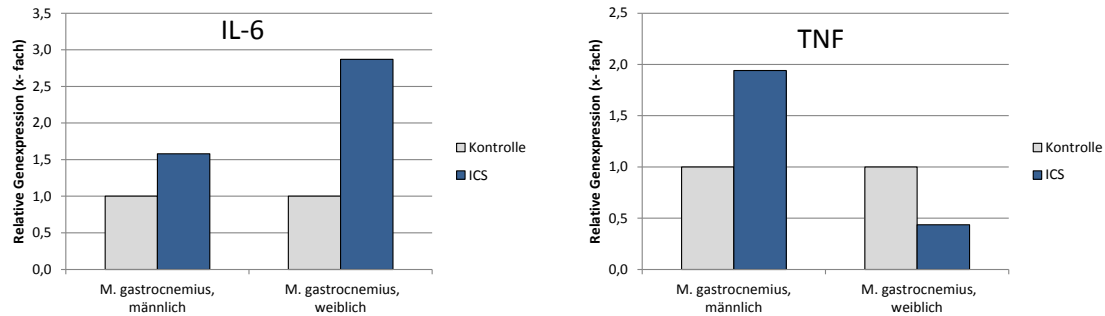
Die relative CD68-Genexpression war bei männlichen ICS-Tieren im M. gastrocnemius im Mittel um 20 % und bei ICS-Weibchen um 50 % gegenüber der jeweiligen Kontrolle vermindert ([Anhang B-11 B](#)).

Immunhistochemische Untersuchungen der Dichte CD68<sup>+</sup>-Zellen im M. gastrocnemius zeigten bei männlichen ICS-Tieren (111,0 + 20,4 [n/mm<sup>2</sup>]) im Vergleich zur Kontrolle (62,8 + 14,6 [n/mm<sup>2</sup>]) eine Zunahme an CD68<sup>+</sup>-Zellen um 76,8 % (P = 0,079). Im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere (106,9 + 24,1 [n/mm<sup>2</sup>]) fand sich gegenüber der Kontrolle (98,0 + 7,8 [n/mm<sup>2</sup>]) eine Zunahme CD68<sup>+</sup>-Zellen um 9,1 % (P = 0,878) ([Anhang B-11 A](#)).

### 3.2.4.5 IL-6 und TNF

Die Untersuchung der Expressionen der proinflammatorischen IL-6- und TNF-Gene im M. gastrocnemius wurde mittels qRT-PCR durchgeführt.

Bei männlichen ICS-Tieren war im M. gastrocnemius die relative Expression des IL-6-Gens um 60 % und die des TNF-Gens um 90 % im Vergleich zur Kontrolle erhöht ([Abbildung 29](#)). Bei weiblichen ICS-Tieren war im M. gastrocnemius die relative Expression des IL-6-Gens um 190 % gegenüber der Kontrolle erhöht, während die relative TNF-Genexpression um 60 % vermindert war ([Abbildung 29](#)).



**Abbildung 29:** Relative Expressionen (qRT-PCR) der IL-6- und TNF-Gene im M. gastrocnemius von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

### 3.2.5 Wirkung von ICS auf Atrophie-relevante Marker

#### 3.2.5.1 MuRF1

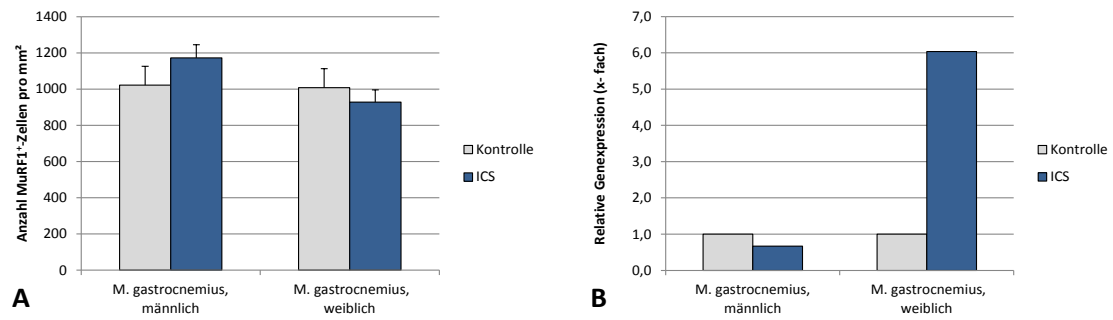
Neben der Wirkung von ICS auf proinflammatorische Parameter wurde auch dessen Auswirkung auf Atrophie-relevante Marker im M. gastrocnemius untersucht.

Hierzu wurden in immunhistochemischen Untersuchungen die Primärantikörper anti-MuRF1 und anti-Fbxo32 eingesetzt.

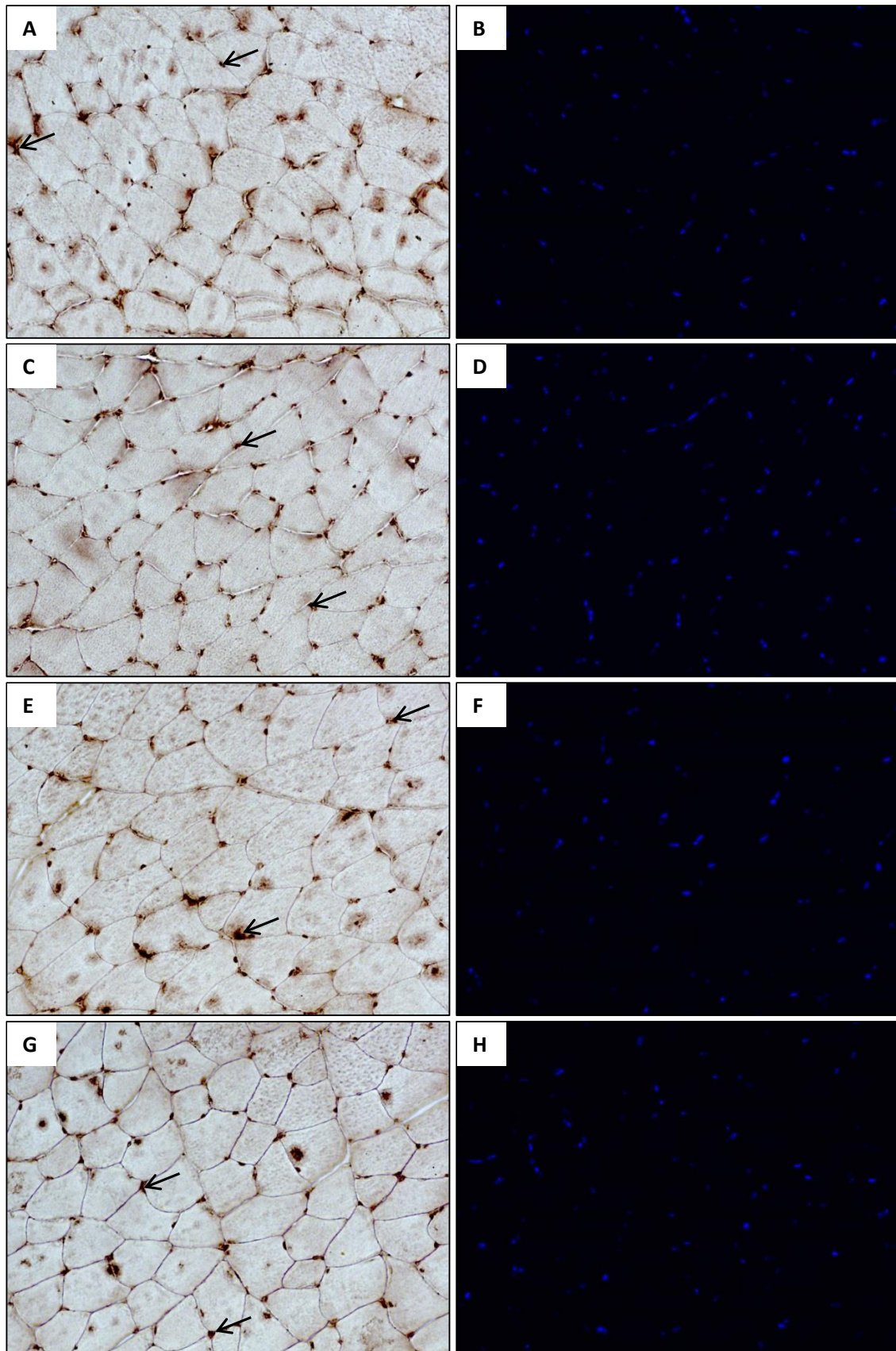
Mittels qRT-PCR wurden die relativen Expressionen der MuRF1- und Fbxo32-Gene analysiert.

Die relative Expression des MuRF1-Gens war im M. gastrocnemius von männlichen ICS-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren um 30 % vermindert und bei weiblichen ICS-Tieren im Vergleich zur Kontrolle um 500 % erhöht ([Abbildung 30 B](#)).

Nach immunhistochemischer Färbung ([Abbildung 31](#)) ergab sich im M. gastrocnemius von männlichen ICS-Tieren ( $1172,0 \pm 73,5$  [n/mm<sup>2</sup>]) eine 14,7 %ige Zunahme der Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ( $1021,9 \pm 104,5$  [n/mm<sup>2</sup>]) ( $P = 0,087$ ) ([Abbildung 30 A](#)). Bei weiblichen ICS-Tieren ( $928,5 \pm 67,3$  [n/mm<sup>2</sup>]) zeigte sich eine 7,8 %ige Abnahme MuRF1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ( $1007,3 \pm 105,4$  [n/mm<sup>2</sup>]) ([Abbildung 30 A](#)).



**Abbildung 30:** MuRF1 im M. gastrocnemius. (A): Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016). (B): Relative Expression (qRT-PCR) des MuRF1-Gens im M. gastrocnemius von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

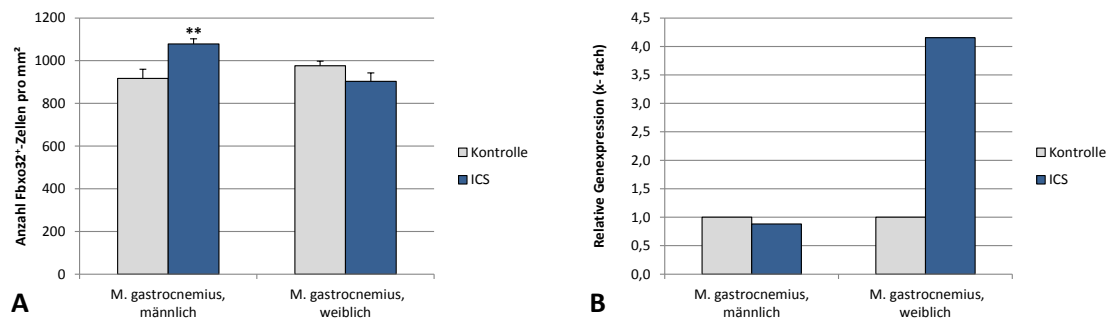


**Abbildung 31:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-MuRF1-Antikörpern (schwarze Pfeile) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): MuRF1-Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen Kontrolle und (B) Kernfärbung. (C): MuRF1-Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen ICS-Maus und (D) Kernfärbung. (E): MuRF1-Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen Kontrolle und (F) Kernfärbung. (G): MuRF1-Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kernfärbung. Originalvergrößerung: x200 (Bonaterra et al., 2016).

### 3.2.5.2 Fbxo32

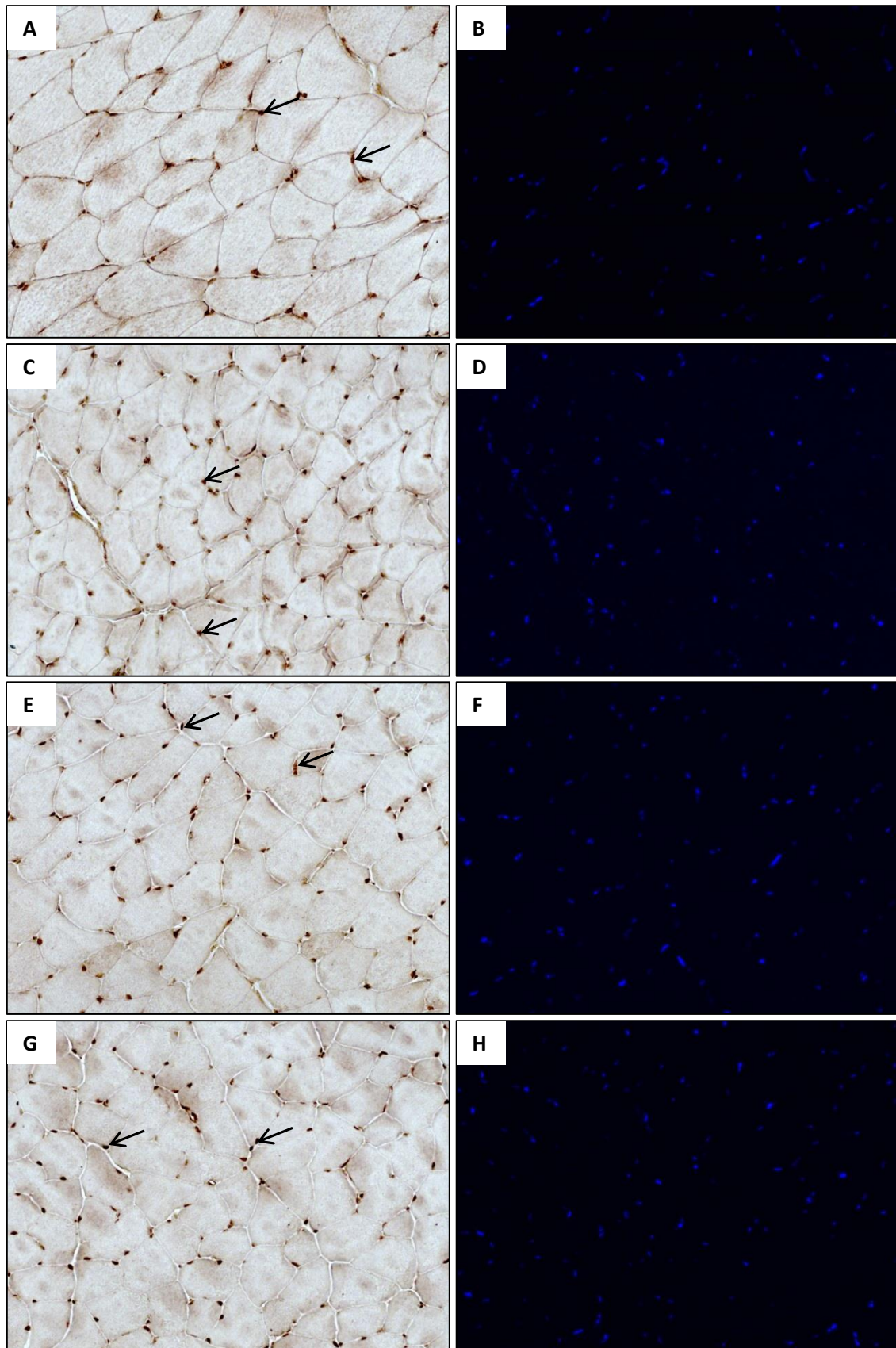
In der qRT-PCR konnte im M. gastrocnemius von männlichen ICS-Tieren eine um 10 % niedrigere relative Genexpression des Fbxo32-Gens im Vergleich zur Kontrolle ([Abbildung 32 B](#)) gefunden werden. Bei weiblichen ICS-Mäusen war die relative Expression des Fbxo32-Gens im Vergleich zur Kontrolle um 320 % höher ([Abbildung 32 B](#)).

In der immunhistochemischen Färbung mit anti-Fbxo32-Antikörpern ([Abbildung 33](#)) zeigte sich im M. gastrocnemius von männlichen ICS-Tieren eine signifikant ( $P = 0,007$ ) um 17,7 % erhöhte Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen ( $1078,6 \pm 24,2$  [n/mm<sup>2</sup>]) gegenüber der Kontrolle ( $916,7 \pm 43,0$  [n/mm<sup>2</sup>]). Bei weiblichen ICS-Tieren war im M. gastrocnemius die Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen ( $903,7 \pm 39,3$  [n/mm<sup>2</sup>]) ähnlich wie bei der Kontrollgruppe ( $975,8 \pm 21,6$  [n/mm<sup>2</sup>]) ([Abbildung 32 A](#)).



**Abbildung 32:** Fbxo32 im M. gastrocnemius. (A): Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. \*\*  $P < 0,01$  vs. Kontrolle. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016). (B): Relative Expression (qRT-PCR) des Fbxo32-Gens im M. gastrocnemius von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).





**Abbildung 33:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-Fbxo32-Antikörpern (schwarze Pfeile) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): Fbxo32-Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen Kontrolle und (B) Kernfärbung. (C): Fbxo32-Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen ICS-Maus und (D) Kernfärbung. (E): Fbxo32-Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen Kontrolle und (F) Kernfärbung. (G): Fbxo32-Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kernfärbung. Originalvergrößerung: x200 (Bonaterra et al., 2016).

### 3.2.6 Korrelationen zwischen der Dichte an MIF<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, IL-1β<sup>+</sup>, MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius

Im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere korrelierte die Dichte (n/mm<sup>2</sup>) inflammatorischer Zellen (MIF<sup>+</sup>, IL-1β<sup>+</sup>) positiv mit der Dichte der MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen wie auch mit der Faserdichte ([Tabelle 9](#)). Außerdem zeigte sich bei männlichen ICS-Mäusen im M. gastrocnemius eine inverse Korrelation zwischen der Dichte inflammatorischer Zellen (MIF<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, IL-1β<sup>+</sup>) und der Faserquerschnittsfläche ([Tabelle 9](#)).

Die Dichte Atrophie-relevanter Zellen (MuRF1<sup>+</sup>, Fbxo32<sup>+</sup>) männlicher ICS-Tiere im M. gastrocnemius korrelierte ebenfalls positiv mit der Faserdichte bzw. invers mit der Faserquerschnittsfläche ([Tabelle 9](#)).

| M. gastrocnemius                           |     | MIF <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | CD68 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | MuRF1 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Fbxo32 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Faserdichte<br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Faserquerschnittsfläche (μm <sup>2</sup> ) | Kapillarkontakte/Muskelfaser (n/Faser) |
|--|-----|--|---|--|---|-------------------------------------|--|--|
| IL-1β <sup>+</sup>                         | r   | 0,4                                      | -0,045                                    | 0,573                                      | 0,589                                       | 0,546                               | -0,179                                     | -0,144                                 |
| (n/mm <sup>2</sup> )                       | P < | 0,156                                    | 0,878                                     | 0,0323                                     | 0,0266                                      | 0,0433                              | 0,541                                      | 0,624                                  |
| MIF <sup>+</sup>                           | r   |  | -0,165                                    | 0,842                                      | 0,523                                       | 0,731                               | -0,566                                     | 0,328                                  |
| (n/mm <sup>2</sup> )                       | P < |  | 0,574                                     | 0,00016                                    | 0,0548                                      | 0,00419                             | 0,0348                                     | 0,258                                  |
| CD68 <sup>+</sup>                          | r   |  |   | -0,0766                                    | 0,418                                       | 0,337                               | -0,473                                     | -0,633                                 |
| (n/mm <sup>2</sup> )                       | P < |  |   | 0,795                                      | 0,137                                       | 0,238                               | 0,0879                                     | 0,015                                  |
| MuRF1 <sup>+</sup>                         | r   |  |   |  | 0,745                                       | 0,744                               | -0,574                                     | 0,059                                  |
| (n/mm <sup>2</sup> )                       | P < |  |   |  | 0,00221                                     | 0,00229                             | 0,032                                      | 0,841                                  |
| Fbxo32 <sup>+</sup>                        | r   |  |   |  |   | 0,855                               | -0,593                                     | -0,368                                 |
| (n/mm <sup>2</sup> )                       | P < |  |   |  |   | 0,000096                            | 0,0253                                     | 0,195                                  |
| Faserdichte                                | r   |  |   |  |   |                                     | -0,767                                     | -0,261                                 |
| (n/mm <sup>2</sup> )                       | P < |  |   |  |   |                                     | 0,00138                                    | 0,368                                  |
| Faserquerschnittsfläche (μm <sup>2</sup> ) | r   |  |   |  |   |                                     |  | 0,326                                  |
|  | P < |  |   |  |   |                                     |  | 0,255                                  |

**Tabelle 9:** Korrelationen zwischen der Dichte MIF<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, IL-1β<sup>+</sup>, MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere (Bonaterra et al., 2016).

Im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere korrelierte die Dichte (n/mm<sup>2</sup>) MIF<sup>+</sup>-Zellen ebenfalls positiv mit der Dichte MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen ([Tabelle 10](#)). Weiterhin korrelierte die Dichte MIF<sup>+</sup>- wie auch die Dichte der IL-1β<sup>+</sup>-Zellen im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere positiv mit der Faserdichte ([Tabelle 10](#)). Die Dichte MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere korrelierte ebenfalls positiv

mit der Faserdichte. Die Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere korrelierte invers mit der Faserquerschnittsfläche ([Tabelle 10](#)).

Die Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere korrelierte positiv mit der Dichte IL-1β<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen ([Tabelle 10](#)).

| M. gastrocnemius                              |     | MIF <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | CD68 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | MuRF1 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Fbxo32 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Faserdichte<br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Faserquerschnittsfläche<br>(μm <sup>2</sup> ) | Kapillarkontakte/<br>Muskelfaser (n/Faser) |
|---|-----|--|---|--|---|-------------------------------------|---|--|
| IL-1β <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )    | r   | 0,108                                    | 0,573                                     | 0,00354                                    | 0,247                                       | 0,591                               | -0,438  | 0,519                                      |
|   | P < | 0,691                                    | 0,0205                                    | 0,990                                      | 0,356                                       | 0,016                               | 0,0894  | 0,0393                                     |
| MIF <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )      | r   |  | -0,145                                    | 0,809                                      | 0,511                                       | 0,631                               | -0,375  | 0,203                                      |
|   | P < |  | 0,592                                     | 0,000146                                   | 0,0433                                      | 0,00875                             | 0,152   | 0,451                                      |
| CD68 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )     | r   |  |   | -0,404                                     | -0,0412                                     | 0,117                               | 0,198   | 0,291                                      |
|   | P < |  |   | 0,121                                      | 0,88  | 0,667                               | 0,463   | 0,275                                      |
| MuRF1 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )    | r   |  |   |  | 0,367                                       | 0,688                               | -0,582  | -0,0642                                    |
|   | P < |  |   |  | 0,162                                       | 0,00324                             | 0,018   | 0,813                                      |
| Fbxo32 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )   | r   |  |   |  |   | 0,523                               | -0,255  | 0,602                                      |
|   | P < |  |   |  |   | 0,0378                              | 0,34  | 0,0136                                     |
| Faserdichte<br>(n/mm <sup>2</sup> )           | r   |  |   |  |   |                                     | -0,696  | 0,25                                       |
|   | P < |  |   |  |   |                                     | 0,00275                                       | 0,351                                      |
| Faserquerschnittsfläche<br>(μm <sup>2</sup> ) | r   |  |   |  |   |                                     |   | 0,0393                                     |
|   | P < |  |   |  |   |                                     |   | 0,885                                      |

**Tabelle 10:** Korrelationen zwischen der Dichte MIF<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>-, IL-1β<sup>+</sup>-, MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere.

### 3.2.7 Wirkung von ICS auf Apoptose-relevante Gene

Zusätzlich zu der Bestimmung des Einflusses von ICS auf Inflammations- und Atrophie-relevante Gene/Proteine im M. gastrocnemius wurde auch die Wirkung auf Apoptose-relevante Gene untersucht. Hierzu wurden die relativen Expressionen der Bcl-2-, Bax- und Casp3-Gene mittels qRT-PCR analysiert

Die Untersuchung des Bcl-2-Gens im M. gastrocnemius ergab bei ICS-Männchen bzw. ICS-Weibchen im Vergleich zu Kontrolltieren eine um 50 % bzw. 40 % verminderte relative Expression ([Anhang B-12](#)).

Die relative Expression des Casp3-Gens war im M. gastrocnemius von männlichen ICS-Tieren gegenüber Kontrollen ähnlich, bei weiblichen ICS-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch um 60 % reduziert ([Anhang B-12](#)). Die Analyse des Bax-Gens

zeigte bei männlichen bzw. weiblichen ICS-Tieren eine ähnliche relative Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ([Anhang B-12](#)).

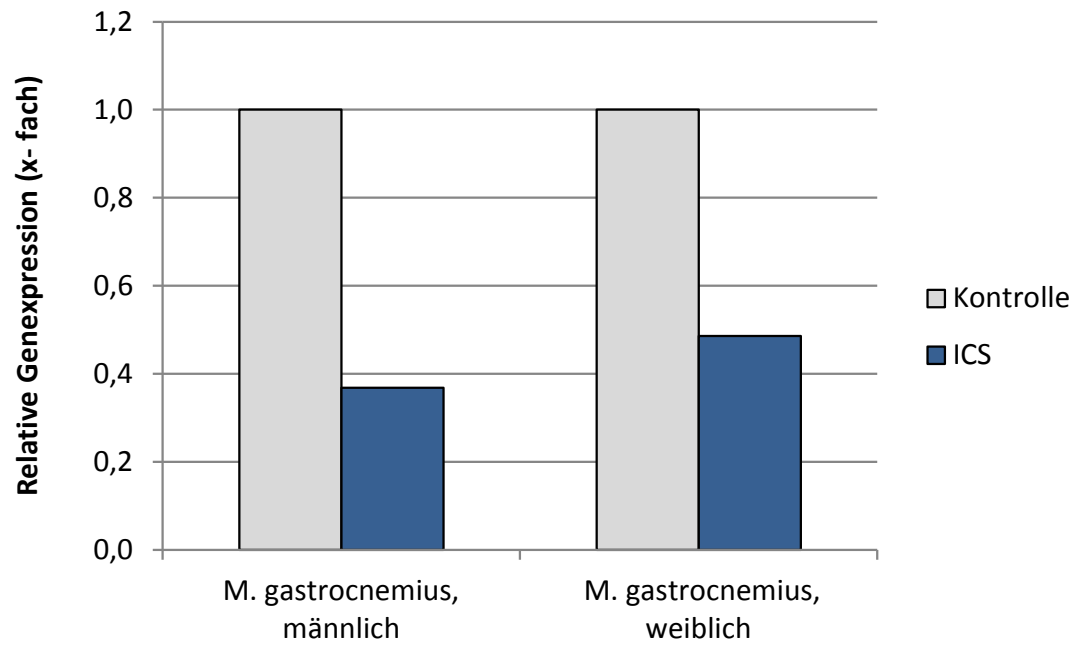
### 3.2.8 Einfluss von ICS auf die Innervation

Zur Untersuchung des Einflusses von ICS auf die Innervation des M. gastrocnemius wurde zum einen die mittlere Anzahl motorischer Endplatten pro Muskelfaser mittels  $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung bestimmt ([Anhang B-13](#)).

Zum anderen wurde die relative Expression nikotinerger Acetylcholinrezeptoren auf RNA-Level durch Bestimmung der relativen Expression des Chrna1-Gens in der qRT-PCR untersucht.

Die relative Expression des Chrna1-Gens war im M. gastrocnemius bei männlichen ICS-Tieren um 60 % und bei weiblichen ICS-Tieren um 50 % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle reduziert ([Abbildung 34](#)).

In der mittleren Anzahl motorischer Endplatten pro Muskelfaser existierten im M. gastrocnemius weder bei männlichen noch weiblichen ICS-Tieren ( $0,03 \pm 0,0$  bzw.  $0,03 \pm 0,0$  [n/Muskelfaser]) signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrolltieren ( $0,03 \pm 0,0$  bzw.  $0,03 \pm 0,0$  [n/Muskelfaser]) ([Anhang B-14](#)).



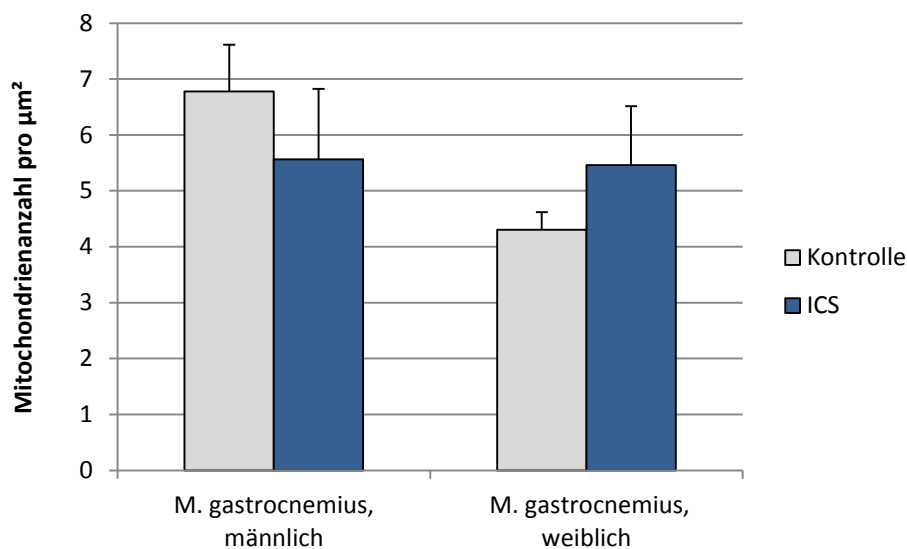
**Abbildung 34:** Relative Expression (qRT-PCR) des Chrna1-Gens im M. gastrocnemius von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

### 3.2.9 Analyse der Mitochondrien

#### 3.2.9.1 Anzahl und Größe der Mitochondrien

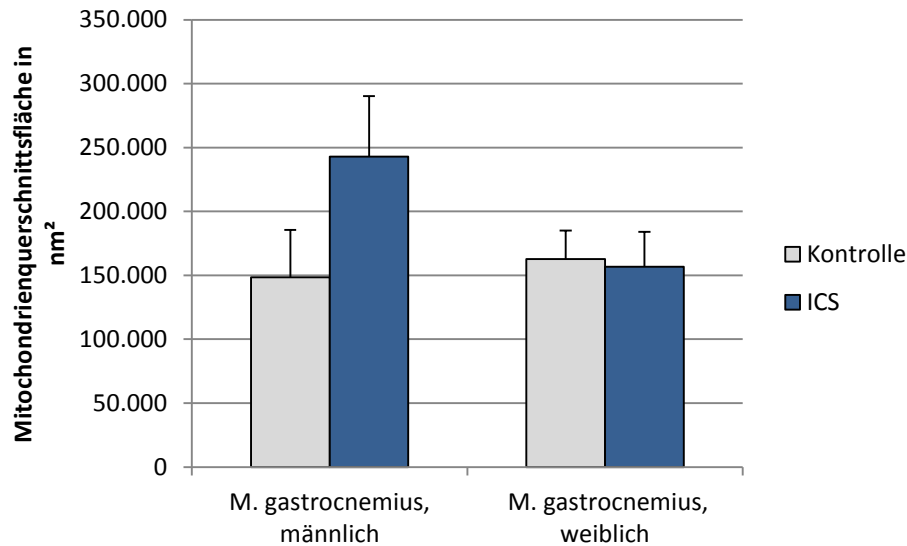
Neben der Frage, ob ICS einen Einfluss auf Entzündung, Atrophie, Apoptose und Innervation im M. gastrocnemius hat, wurde mittels Elektronenmikroskopie ([Abbildung 38](#)) untersucht, ob ICS subzelluläre Strukturen (Anzahl, Größe und Morphologie der Mitochondrien) beeinflusst.

Bei männlichen ICS-Tieren ( $5,6 \pm 1,3$  [ $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ]) wurde im M. gastrocnemius eine Abnahme der Mitochondriendichte (Mitochondrienzahl/ $\mu\text{m}^2$ ) um 17,6 % ( $P = 0,494$ ) im Vergleich zur Kontrolle ( $6,8 \pm 0,8$  [ $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ]) gefunden. Bei weiblichen ICS-Tieren ( $5,5 \pm 1,1$  [ $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ]) ergab sich im M. gastrocnemius hingegen eine 27,9 %ige ( $P = 0,548$ ) Zunahme der Mitochondriendichte (Mitochondrienzahl/ $\mu\text{m}^2$ ) gegenüber der Kontrolle ( $4,3 \pm 0,3$  [ $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ]) ([Abbildung 35](#)).



**Abbildung 35:** Mitochondriendichte ( $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ) im M. gastrocnemius. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Es wurden pro Gruppe jeweils 5 Tiere ausgewertet (Bonaterra et al., 2016).

Die Untersuchung der mittleren Mitochondrienquerschnittsfläche (in  $\text{nm}^2$ ) zeigte im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere ( $242.876,7 \pm 47.276,4$  [ $\text{nm}^2$ ]) im Vergleich zur Kontrolle ( $148.525,2 \pm 37.127,3$  [ $\text{nm}^2$ ]) eine Zunahme um 63,5 % ( $P = 0,155$ ). Im M. gastrocnemius weiblicher Tiere ergaben sich ähnliche Werte zwischen ICS-Tieren und Kontrolle hinsichtlich der mittleren Mitochondrienquerschnittsfläche ([Abbildung 36](#)).



**Abbildung 36:** Mitochondrienquerschnittsfläche (in nm<sup>2</sup>) im M. gastrocnemius. Die Daten zeigen Mittelwerte +SEM. Es wurden pro Gruppe jeweils 5 Tiere ausgewertet.

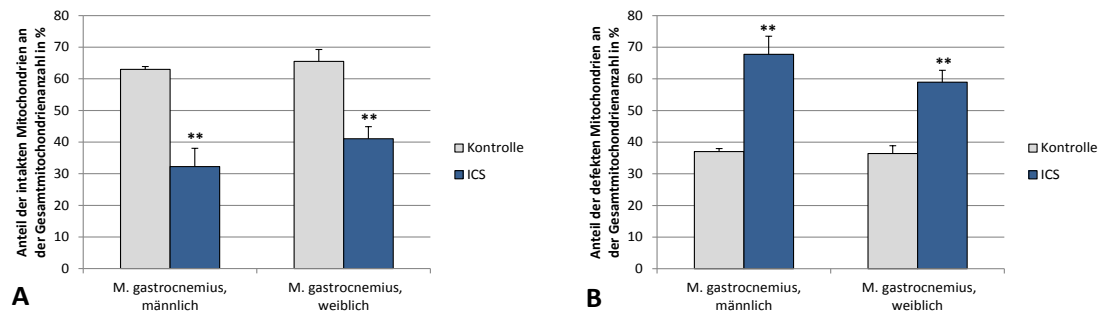
### 3.2.9.2 Bewertung der Morphologie der Mitochondrien

Die Morphologie der Mitochondrien wurde quantifiziert, nachdem diese entweder als „intakt“ oder „defekt“ beurteilt wurden ([Abbildung 21](#)) ([vgl. 2.2.6.3](#)).

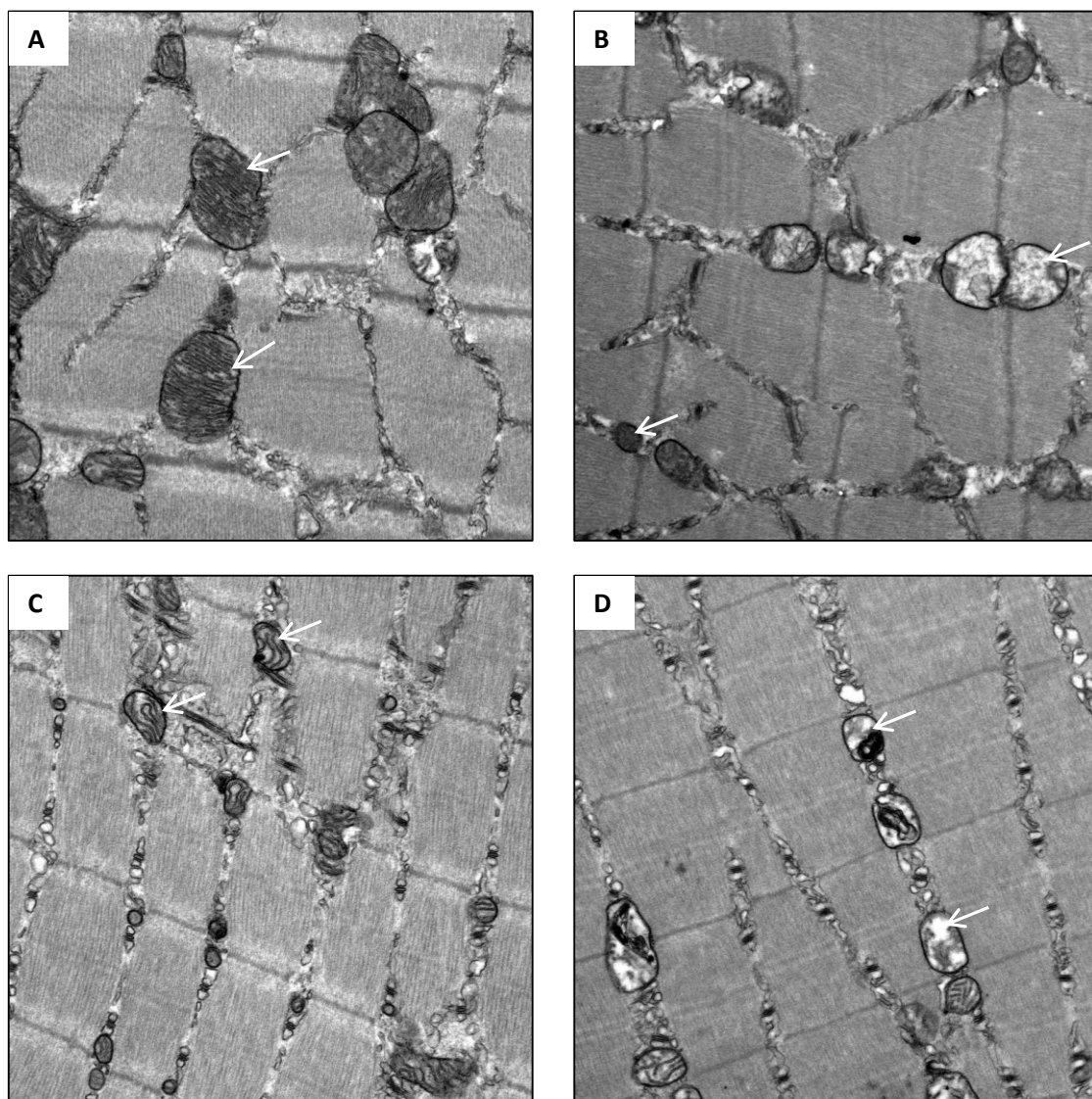
Bei männlichen ICS-Mäusen zeigte sich im M. gastrocnemius im Mittel eine 30,7 %ige Abnahme ( $P = 0,008$ ) intakter Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienzahl gegenüber der Kontrolle wie auch eine 30,7 %ige Zunahme ( $P = 0,008$ ) defekter Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienanzahl ([Abbildung 37 A+B und Abbildung 38](#)).

Auch bei weiblichen ICS-Tieren wurde im M. gastrocnemius eine signifikante ( $P = 0,002$ ) Abnahme der intakten und eine signifikante ( $P = 0,002$ ) Zunahme der defekten Mitochondrien um 22,5 % im Vergleich zur Kontrolle gefunden ([Abbildung 37 A+B und Abbildung 38](#)).





**Abbildung 37:** Morphologie der Mitochondrien im M. gastrocnemius. (A): Anteil der intakten Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienzahl (in %). (B): Anteil der defekten Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienzahl (in %). \*\*  $P < 0,01$  vs. Kontrolle. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Es wurden pro Gruppe jeweils 5 Tiere ausgewertet (Bonaterra et al., 2016).



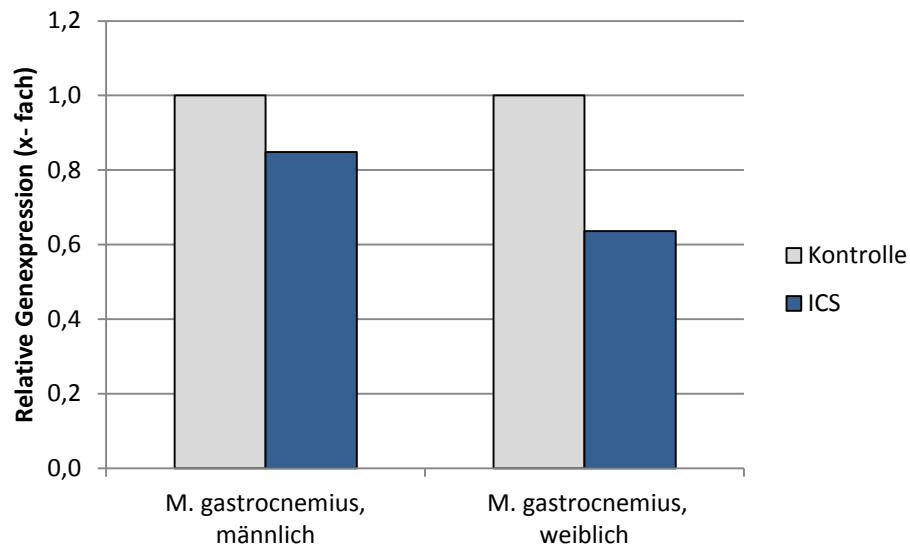
**Abbildung 38:** Exemplarische, elektronenmikroskopische Bilder des M. gastrocnemius zur Beurteilung der Morphologie der Mitochondrien (weiße Pfeile). (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D): Weibliche ICS-Maus. Originalvergrößerung: x20.000 (Bonaterra et al., 2016).



### 3.2.9.3 Superoxiddismutase 2 (Sod2)

Zudem wurde die relative Genexpression der antioxidativ wirkenden Sod2, die in Mitochondrien lokalisiert ist, im M. gastrocnemius bestimmt.

Die relative Expression des Sod2-Gens war im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere um 15 % und im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere um 40 % im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle reduziert ([Abbildung 39](#)).



**Abbildung 39:** Relative Expression (qRT-PCR) des Sod2-Gens im M. gastrocnemius von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

### 3.3 Ergebnisse der Untersuchungen des M. soleus

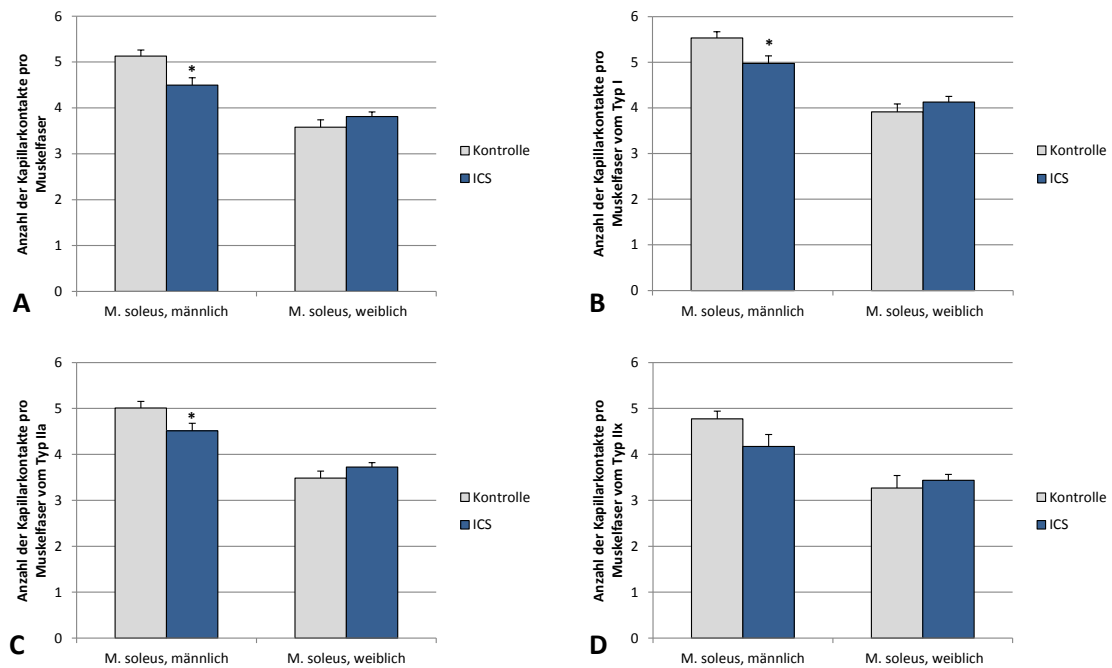
#### 3.3.1 Untersuchung der Kapillarisierung und Angiogenese

Auch im M. soleus wurde die Kapillarisierung des Muskels mit Hilfe der BSI-B<sub>4</sub>-Lectin-Färbung untersucht ([Abbildung 41](#)). Im M. soleus von männlichen bzw. weiblichen ICS-Mäusen war die Kapillardichte (n/mm<sup>2</sup>) im Mittel ähnlich wie bei der jeweiligen Kontrolle ([Anhang C-1](#)).

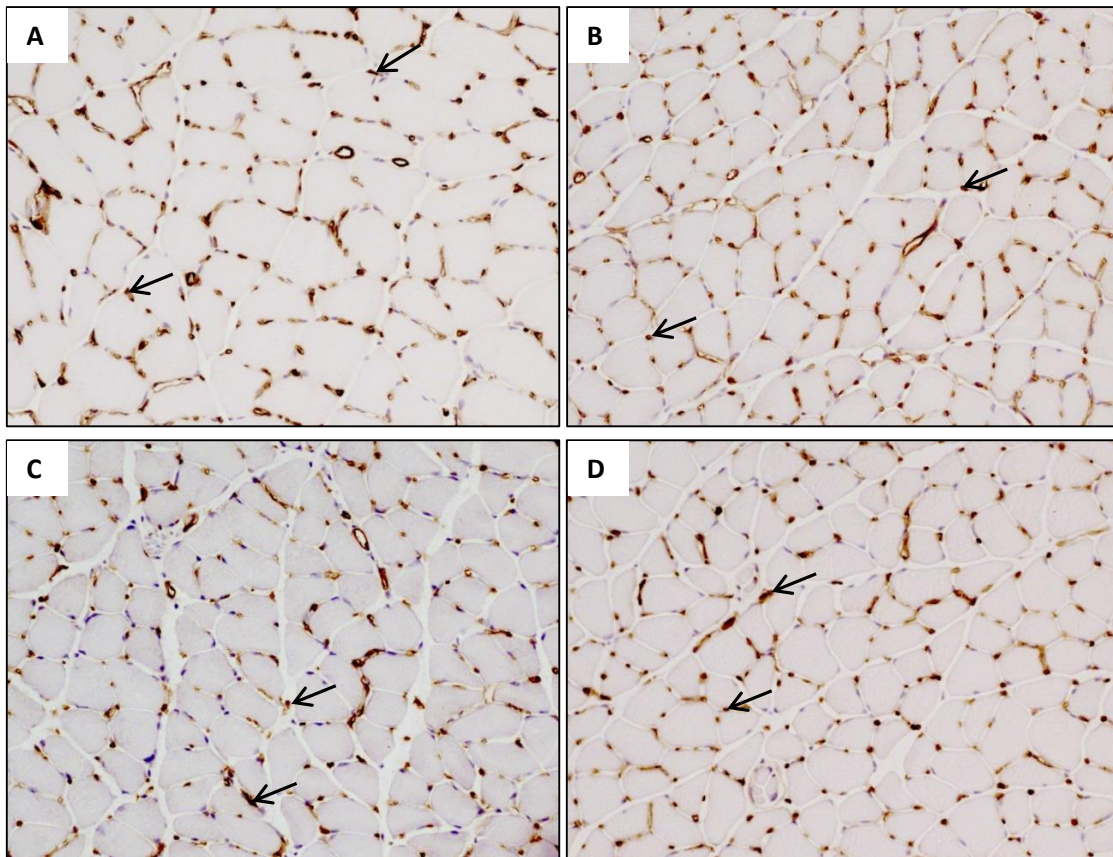
Bei männlichen ICS-Tieren zeigte sich im M. soleus jedoch eine signifikant ( $P = 0,010$ ) um 11,8 % verminderte mittlere Anzahl von Kapillarkontakten pro Muskelfaser ( $4,5 \pm 0,2$  [n/Muskelfaser]) (alle Muskelfasertypen) verglichen mit der Kontrolle ( $5,1 \pm 0,1$  [n/Muskelfaser]). Bei weiblichen ICS-Tieren ( $3,8 \pm 0,1$  [n/Muskelfaser]) war im M. soleus die mittlere Anzahl von Kapillarkontakten pro Muskelfaser ähnlich wie in der Kontrolle ( $3,6 \pm 0,2$  [n/Muskelfaser]) ([Abbildung 40 A](#)).

Die differenzierte Betrachtung der Muskelfasertypen zeigte im M. soleus bei Typ I- und Typ IIa-Muskelfasern männlicher ICS-Mäuse eine signifikante ( $P = 0,024$  bzw.  $P = 0,042$ ) Abnahme der mittleren Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser ( $5,0 \pm 0,2$  bzw.  $4,5 \pm 0,2$  [n/Muskelfaser]) um 9,1 % bzw. 10,0 % im Vergleich zur Kontrolle ( $5,5 \pm 0,1$  bzw.  $5,0 \pm 0,1$  [n/Muskelfaser]) ([Abbildung 40 B + C](#)). Bei den Typ IIx-Fasern existierte im M. soleus kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen ICS- ( $4,2 \pm 0,3$  [n/Muskelfaser]) und Kontrolltieren ( $4,8 \pm 0,2$  [n/Muskelfaser]) ([Abbildung 40 D](#)).

Bei weiblichen ICS-Tieren wurde im M. soleus weder bei den Typ I-, den Typ IIa- noch den Typ IIx-Muskelfasern ein signifikanter Unterschied in der mittleren Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser gegenüber der Kontrolle gefunden ([Abbildung 40 B, C und D](#)).



**Abbildung 40:** Anzahl der Kapillarkontakte der verschiedenen Muskelfasertypen im M. soleus. (A): Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser (Muskelfasertyp nicht berücksichtigt). (B): Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser vom Typ I. (C): Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser vom Typ IIa. (D): Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser vom Typ IIx. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=7, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9. \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle (Bonaterra et al., 2016).



**Abbildung 41:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach BSI-B<sub>4</sub>-Lectin-Färbung. Darstellung der Kapillaren (schwarze Pfeile). (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D) Weibliche ICS-Maus. Zellkerne sind durch Hämatoxylin (blau) gefärbt. Originalvergrößerung: x200 (Bonaterra et al., 2016).

Auch im M. soleus wurde neben der Messung der Kapillarisierung die Angiogenese mittels molekularbiologischer Untersuchungen analysiert.

Hierzu wurden im M. soleus die relativen Expressionen der Vegfa-, Vegfb-, Notch1-, Notch3-, Kdr- (auch VEGFR-2 genannt) und Socs3-Gene mittels qRT-PCR gemessen.

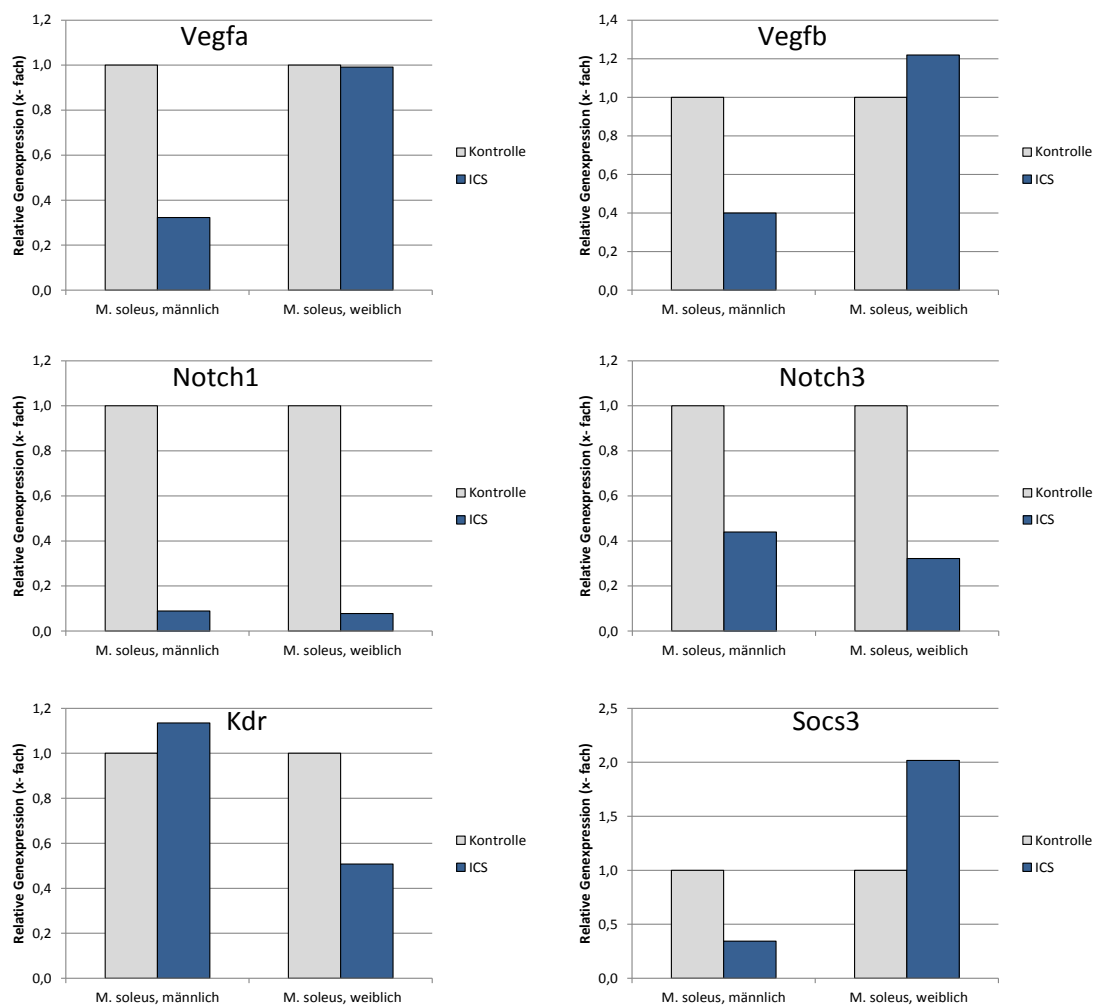
Während die relative Expression des Vegfa-Gens im M. soleus männlicher ICS-Tiere um 70 % gegenüber der Kontrolle vermindert war, blieb diese bei weiblichen ICS-Tieren im Vergleich zur Kontrolle unverändert ([Abbildung 42](#)). Die relative Expression des Vegfb-Gens zeigte ein ähnliches Bild. Sie war im M. soleus männlicher ICS-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle um 60 % reduziert und bei ICS-Weibchen um 20 % erhöht ([Abbildung 42](#)).

Die relative Expression des Notch1-Gens war sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen ICS-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle um 90 % reduziert ([Abbildung 42](#)).

Ebenso war die relative Expression des Notch3-Gens im M. soleus männlicher wie auch weiblicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle um 60 % bzw. um 70 % vermindert ([Abbildung 42](#)).

Hingegen zeigte sich im M. soleus bei der relativen Expression des Kdr-Gens ein etwas uneinheitlicheres Bild. Bei männlichen ICS-Tieren war diese im Vergleich zur Kontrolle um 10 % erhöht, wohingegen sie bei weiblichen ICS-Tieren um 50 % vermindert war ([Abbildung 42](#)).

Ebenso fanden sich im M. soleus bei der relativen Expression des Socs3-Gens deutliche Unterschiede: bei männlichen ICS-Mäusen war diese im Vergleich zur Kontrolle um 70 % reduziert, bei weiblichen ICS-Mäusen jedoch um 100 % erhöht ([Abbildung 42](#)).

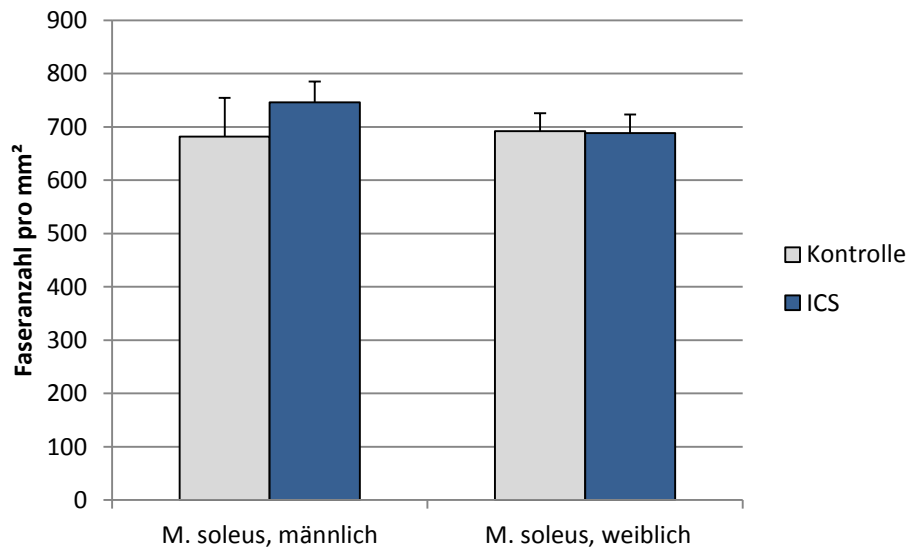


**Abbildung 42:** Relative Expression (qRT-PCR) von Angiogenese-Genen im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

### 3.3.2 Bestimmung der mittleren Faserdichte, der mittleren Faserfläche und der Fasertypkomposition

Als weitere morphologische Aspekte neben der Kapillarisierung wurden auch im M. soleus die mittlere Faserdichte, die mittlere Muskelfaserquerschnittsfläche und die Fasertypkomposition untersucht.

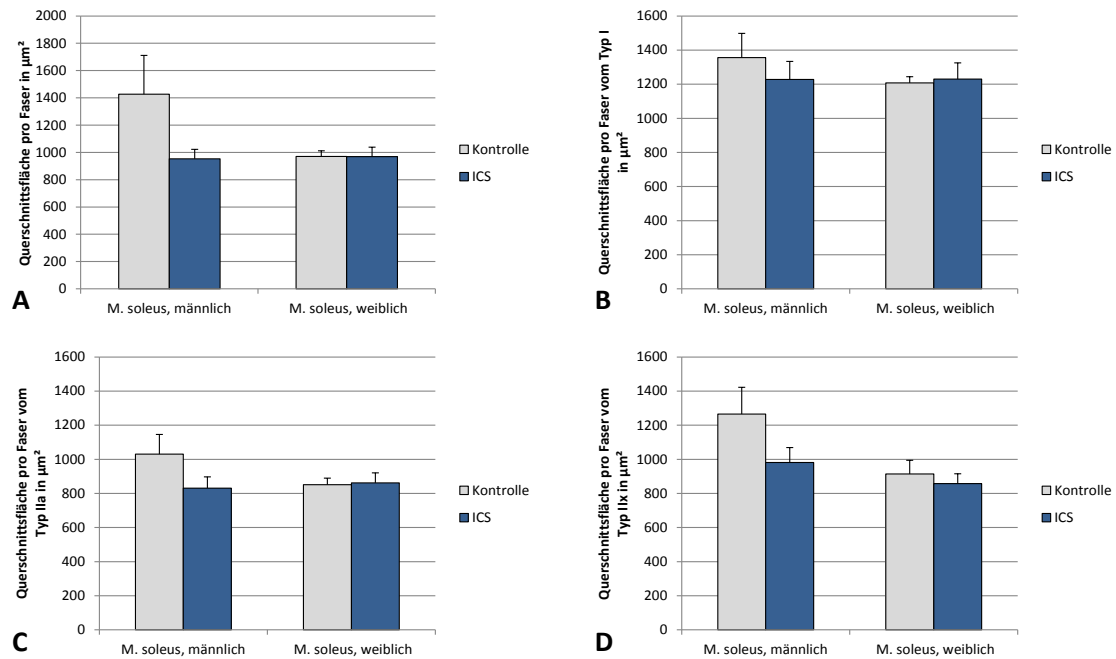
Die mittlere Faserdichte (Fasergesamtzahl/mm<sup>2</sup>) lag im M. soleus männlicher ICS-Tiere (745,7 + 39,2 [n/mm<sup>2</sup>]) um 9,4 % höher als bei der Kontrolle (681,8 + 72,6 [n/mm<sup>2</sup>]) (P = 0,469). Bei weiblichen ICS-Mäusen (688,1 + 35,3 [n/mm<sup>2</sup>]) war sie im Vergleich zur Kontrolle (691,7 + 33,7 [n/mm<sup>2</sup>]) jedoch ähnlich ([Abbildung 43](#)).



**Abbildung 43:** Faserdichte (n/mm<sup>2</sup>) im M. soleus. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016).

Die mittlere Faserquerschnittsfläche (in µm<sup>2</sup>) (alle Muskelfasertypen) war im M. soleus männlicher ICS-Tiere (952,9 + 70,2 [µm<sup>2</sup>]) im Vergleich zur Kontrolle (1427,5 + 284,0 2 [µm<sup>2</sup>]) um 33,2 % verringert (P = 0,094) ([Abbildung 44 A](#)). Bei weiblichen ICS-Tieren (969,7 + 69,4 [µm<sup>2</sup>]) existierte im M. soleus bei der mittleren Faserquerschnittsfläche (alle Muskelfasertypen) kein Unterschied zur Kontrolle (971,0 + 40,8 [µm<sup>2</sup>]) ([Abbildung 44 A](#)). Die mittlere Faserquerschnittsfläche der Typ I-Fasern war im M. soleus männlicher ICS-Tiere (1228,2 + 105,5 [µm<sup>2</sup>]) im Vergleich zur Kontrolle (1355,6 + 142,2 [µm<sup>2</sup>]) um 9,4 % vermindert (P = 0,486) ([Abbildung 44 B](#)).

Hingegen war die mittlere Faserquerschnittsfläche der Typ IIa-Fasern männlicher ICS-Tiere (831,3 + 66,0 [µm<sup>2</sup>]) im Vergleich zu Kontrollen (1030,7 + 114,9 [µm<sup>2</sup>]) um 19,3 % (P = 0,158) verringert ([Abbildung 44 C](#)). Auch die mittlere Faserquerschnittsfläche der Typ IIx-Fasern männlicher ICS-Tiere (981,5 + 87,7 [µm<sup>2</sup>]) war im Vergleich zur Kontrolle (1265,6 + 156,9 [µm<sup>2</sup>]) um 22,4 % (P = 0,140) verringert ([Abbildung 44 D](#)). Diese Unterschiede existierten im M. soleus weiblicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle nicht ([Abbildung 44 B, C und D](#)).



**Abbildung 44:** Querschnittsfläche pro Muskelfasertyp (in  $\mu\text{m}^2$ ) im M. soleus. (A): Muskelfaserquerschnittsfläche unabhängig vom Fasertyp. (B): Typ I-Faserquerschnittsfläche. (C): Typ IIa-Faserquerschnittsfläche. (D): Typ IIx-Faserquerschnittsfläche. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=7, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016).

Die Fasertypkomposition (Anteil der verschiedenen Muskelfasertypen an der Gesamtfaseranzahl in %) war weder bei männlichen noch bei weiblichen ICS-Tieren im Vergleich zur Kontrolle unterschiedlich ([Anhang C-2 A + B und Anhang C 3](#)).

### 3.3.3 Ergebnisse der PAS-Färbung

Zur Bestimmung des Glykogengehalts im M. soleus wurde die PAS-Färbung verwendet.

Weder bei männlichen noch bei weiblichen ICS-Tieren zeigte sich im M. soleus ein signifikanter Unterschied im Glykogengehalt der Muskelfasern im Vergleich zur Kontrolle ([Anhang C-4 A + B und Anhang C-5](#)).

### 3.3.4 Wirkung von ICS auf inflammatorische Parameter

#### 3.3.4.1 IL-1 $\beta$

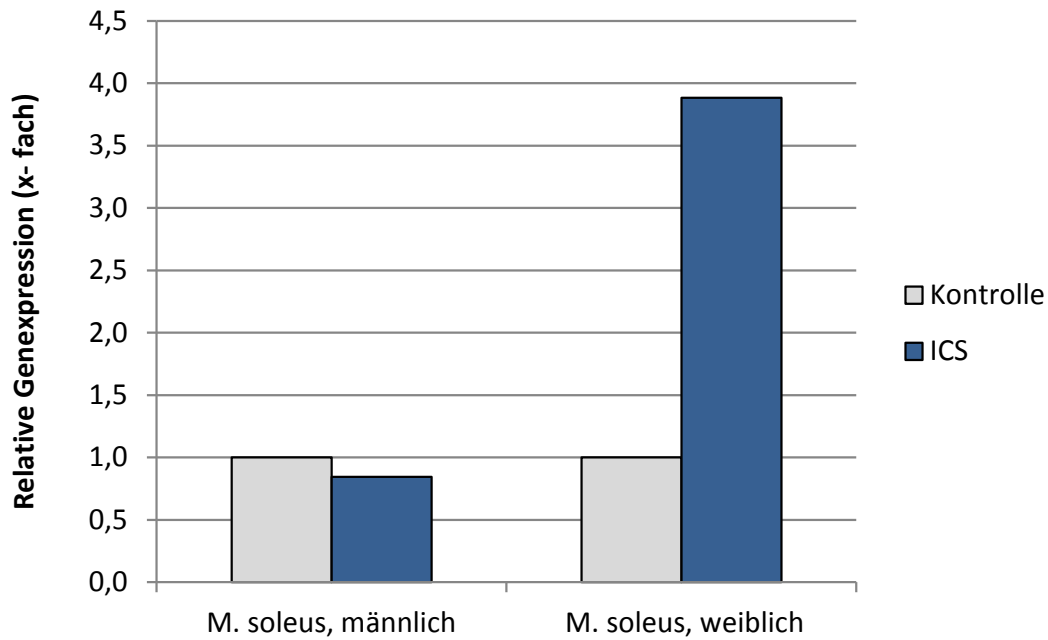
Neben den morphologischen Untersuchungen der Kapillarisation, der Fasertypkomposition und des Glykogengehalts wurde auch die Auswirkung von ICS auf inflammatorische Parameter im M. soleus untersucht. Hierzu wurden auf Muskelquerschnitten immunhistochemische Färbungen mit anti-IL-1 $\beta$ -, anti-COX-2-, anti-MIF- bzw. anti-CD68-Antikörpern durchgeführt.

Zusätzlich wurde mittels molekularbiologischer Methoden (qRT-PCR) die relative Expression der IL-1 $\beta$ -, COX-2-, MIF-, CD68-, IL-6- bzw. TNF-Gene im M. soleus gemessen.

Während die relative Expression des IL-1 $\beta$ -Gens im M. soleus von ICS-Männchen im Vergleich zur Kontrolle um 10 % reduziert war, war sie bei ICS-Weibchen im Vergleich zur Kontrolle um 290 % erhöht ([Abbildung 45](#)).

Immunhistochemische Untersuchungen ([Anhang C-6](#)) des M. soleus zeigten weder bei männlichen noch bei weiblichen ICS-Tieren (1901,6 + 47,1 bzw. 1600,8 + 61,2 [n/mm<sup>2</sup>]) signifikante Differenzen in der Dichte (n/mm<sup>2</sup>) IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (1762,8 + 58,7 bzw. 1715,4 + 42,3 [n/mm<sup>2</sup>]) ([Anhang C-7](#)).



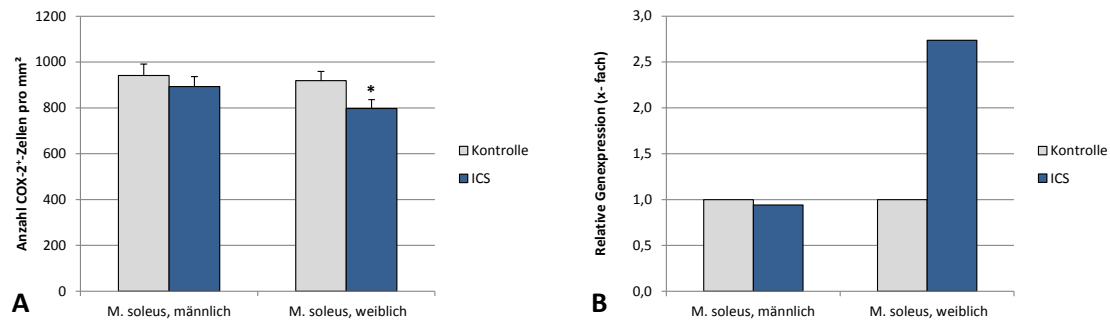


**Abbildung 45:** Relative Expression (qRT-PCR) des IL-1 $\beta$ -Gens im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

### 3.3.4.2 Cyclooxygenase 2

Mittels qRT-PCR konnte im M. soleus männlicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle eine um 10 % verminderte relative Expression des COX-2-Gens nachgewiesen werden. Bei weiblichen ICS-Tieren fand sich im M. soleus hingegen eine um 170 % gesteigerte relative Expression des COX-2-Gens im Vergleich zur Kontrolle ([Abbildung 46 B](#)).

Immunhistochemische Untersuchungen mit anti-COX-2-Antikörpern erfolgten auch im M. soleus als eine Doppelfärbung mit biotinyliertem BSI-Lectin zur gleichzeitigen Darstellung der Kapillaren ([Anhang C-9](#)). Die Dichte COX-2<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>) (COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren ausgenommen) war im M. soleus männlicher ICS-Tiere (892,9 + 43,5 [n/mm<sup>2</sup>]) im Vergleich zu der Kontrolle (941,4 + 49,6 [n/mm<sup>2</sup>]) ähnlich (P = 0,473) ([Abbildung 46 A](#)). Die Dichte COX-2<sup>+</sup>-Zellen (COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren ausgenommen) war im M. soleus weiblicher ICS-Tiere (797,3 + 38,4 [n/mm<sup>2</sup>]) im Vergleich zu Kontrolltieren (918,6 + 40,5 [n/mm<sup>2</sup>]) um 13,2 % signifikant (P = 0,046) vermindert ([Abbildung 46 A](#)).



**Abbildung 46:** COX-2 im M. soleus. (A): Dichte COX-2<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>) (COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren ausgenommen) im M. soleus. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9. \*  $P \leq 0,05$  vs. Kontrolle. (B): Relative Expression (qRT-PCR) des COX-2-Gens im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

Der Anteil COX-2<sup>+</sup>-positiver Kapillaren an der Gesamtkapillaranzahl in % war im M. soleus männlicher bzw. weiblicher ICS-Tiere im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ähnlich ([Anhang C-8](#)).

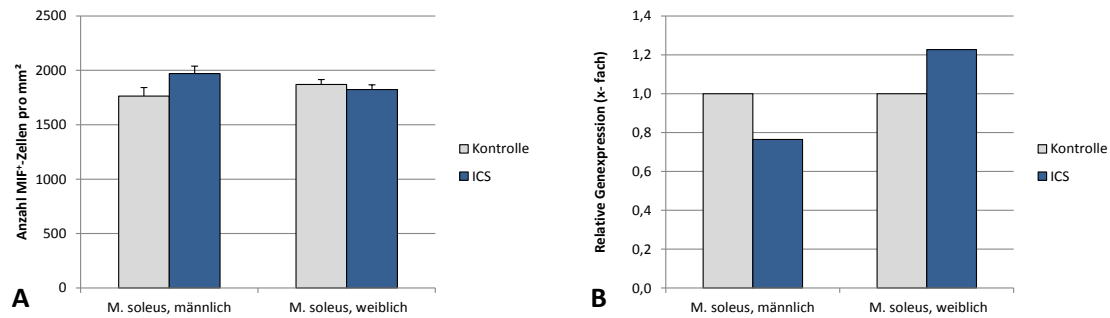
Zur Überprüfung der Co-Lokalisation von COX-2 und Gefäßen wurde eine Doppelfärbung mit anti-COX-2-Antikörpern und biotinyliertem Lectin angefertigt. Die COX-2-Reaktion wurde mittels Cy3-konjugierter Affe anti-Kaninchen Antikörper sichtbar gemacht. Die Lokalisation von COX-2 in Kapillaren wie auch in größeren Gefäßen konnte nachgewiesen werden ([Anhang C-10](#)).

### 3.3.4.3 MIF

Als weiterer Entzündungsmarker wurde MIF im M. soleus mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen ([Anhang C-11](#)) und mittels qRT-PCR untersucht.

Die qRT-PCR zeigte, dass im M. soleus männlicher ICS-Tiere die relative Expression des MIF-Gens im Vergleich zur Kontrolle um 20 % vermindert und im M. soleus weiblicher ICS-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle 20 % höher war ([Abbildung 47 B](#)).

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte im M. soleus männlicher ICS-Tiere ( $1969,9 \pm 69,7$  [n/mm<sup>2</sup>]) ein nicht-signifikanter ( $P = 0,067$ ) mittlerer Anstieg der Dichte (n/mm<sup>2</sup>) MIF<sup>+</sup>-Zellen um 11,7 % gegenüber der Kontrolle ( $1763,1 \pm 78,3$  [n/mm<sup>2</sup>]) nachgewiesen werden. Im M. soleus weiblicher ICS-Tiere zeigte sich eine ähnliche Dichte MIF<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ([Abbildung 47 A](#)).



**Abbildung 47:** MIF im M. soleus. (A): Dichte MIF<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016). (B): Relative Expression (qRT-PCR) des MIF-Gens von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

#### 3.3.4.4 CD68

Neben den Entzündungsmarkern IL-1 $\beta$ , COX-2 und MIF wurde ferner der Makrophagenmarker CD68 analysiert. Hierzu wurde zum einen eine immunhistochemische Färbung mit anti-CD68-Primärantikörpern ([Anhang C-12](#)) und weiterhin zur Ermittlung der relativen Expression des CD68-Gens eine qRT-PCR durchgeführt.

Mittels qRT-PCR zeigte sich im M. soleus männlicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle eine Verminderung der relativen Expression des CD68-Gens um 50 %, bei weiblichen ICS-Tieren im Vergleich zur Kontrolle hingegen eine Steigerung um 40 % ([Anhang C-13 B](#)).

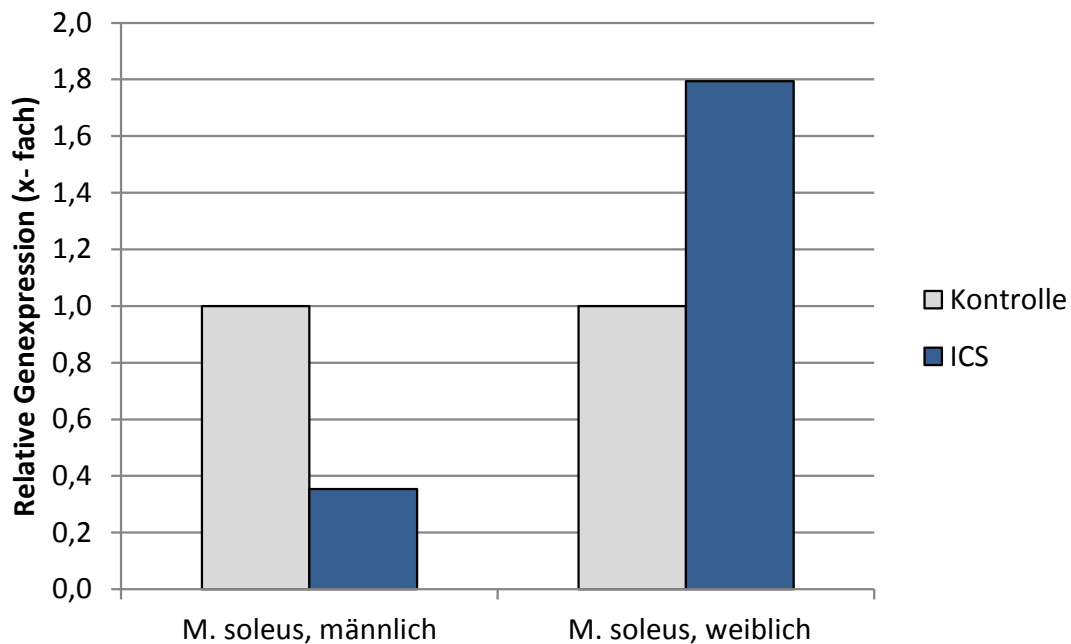
Immunhistochemische Untersuchungen ergaben im M. soleus männlicher ICS-Tiere (139,7 + 34,6 [n/mm<sup>2</sup>]) im Vergleich zur Kontrolle (98,0 + 28,8 [n/mm<sup>2</sup>]) eine Dichtezunahme CD68<sup>+</sup>-Zellen um 42,6 % (P = 0,380). Im M. soleus weiblicher ICS-Tiere zeigte sich die Dichte CD68<sup>+</sup>-Zellen (140,0 + 52,3 [n/mm<sup>2</sup>]) im Vergleich zur Kontrolle (116,2 + 29,0 [n/mm<sup>2</sup>]) um 20,7 % erhöht (P = 0,645) ([Anhang C-13 A](#)).

#### 3.3.4.5 IL-6 und TNF

Als weitere proinflammatorische Parameter wurden im M. soleus die relativen Expressionen der IL-6- und TNF-Gene gemessen.

Während männliche ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle im M. soleus eine um 60 % verminderte relative IL-6-Genexpression aufwiesen, zeigte sich bei weiblichen ICS-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle eine um 80 % gesteigerte Expression ([Abbildung 48](#)).

Die relative Expression des TNF-Gens war im M. soleus bei männlichen/weiblichen ICS-Tieren ähnlich wie bei der jeweiligen Kontrolle ([Anhang C-14](#)).



**Abbildung 48:** Relative Expression (qRT-PCR) des IL-6-Gens im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

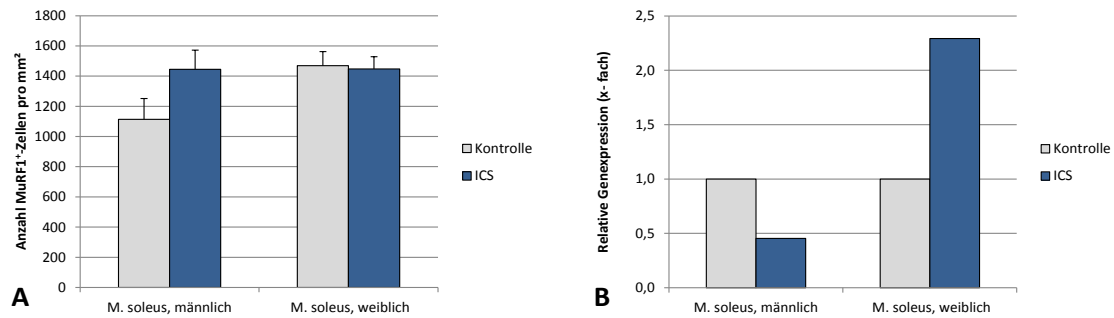
### 3.3.5 Wirkung von ICS auf Atrophie-relevante Marker

#### 3.3.5.1 MuRF1

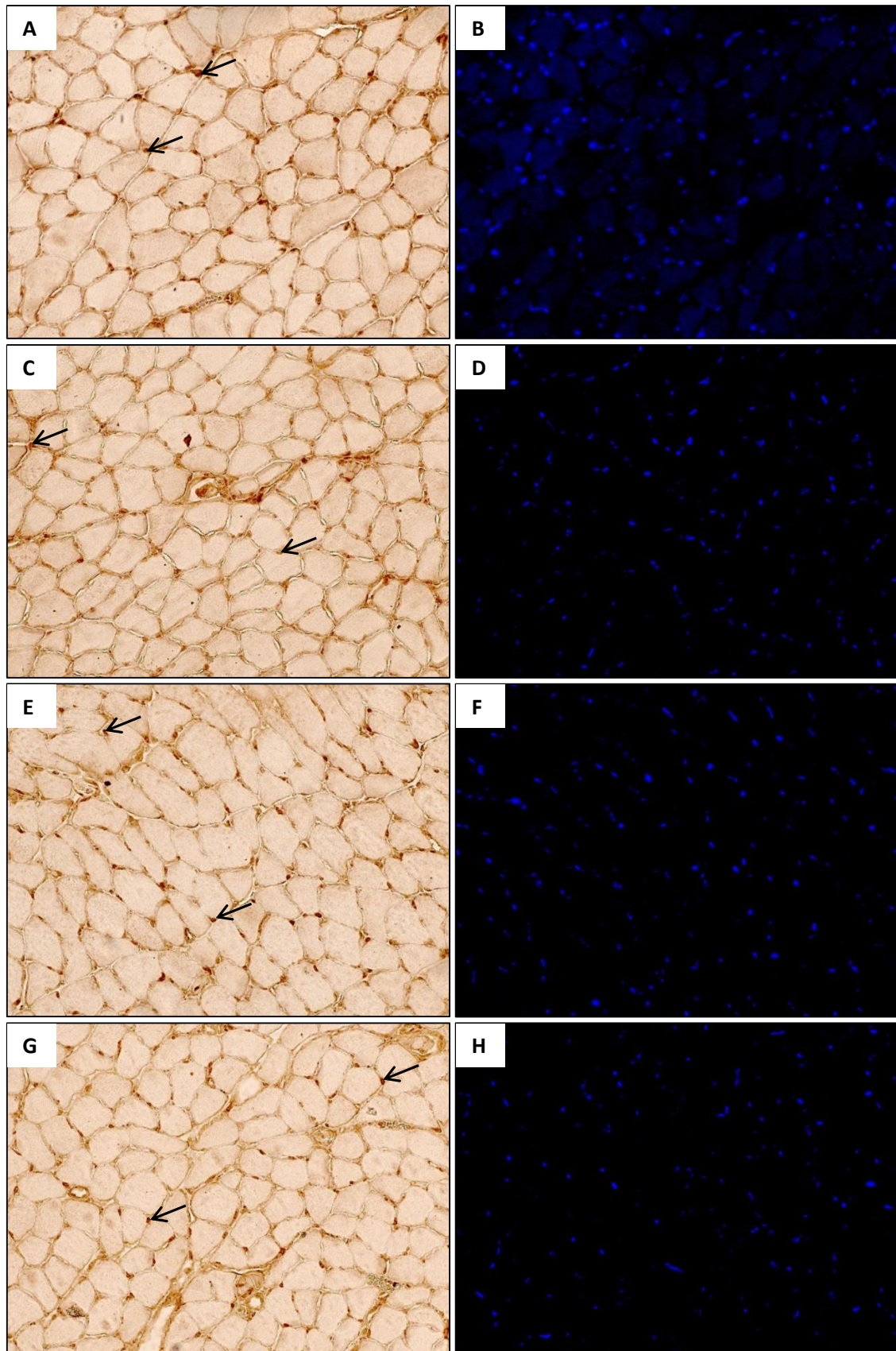
Neben den schon genannten Untersuchungen war ferner auch im M. soleus von Interesse, ob ICS Atrophie-relevante Marker der Muskulatur verändert. Dazu wurden zum einen immunhistochemische Färbungen mit anti-MuRF1- und anti-Fbxo32-Antikörpern angefertigt. Zum anderen wurden die relativen Expressionen der MuRF1- und Fbxo32-Gene mittels qRT-PCR analysiert.

Die relative Expression des MuRF1-Gens war im M. soleus männlicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle um 50 % reduziert und bei weiblichen ICS-Tieren im Vergleich zur Kontrolle um 130 % erhöht ([Abbildung 49 B](#)).

Immunhistochemische Untersuchungen des M. soleus mit anti-MuRF1-Antikörpern ([Abbildung 50](#)) zeigten, dass männliche ICS-Tiere ( $1445,4 \pm 126,5$  [n/mm<sup>2</sup>]) eine um 29,7 % ( $P = 0,095$ ) erhöhte Dichte (n/mm<sup>2</sup>) MuRF1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ( $1114,3 \pm 137,2$  [n/mm<sup>2</sup>]) aufweisen ([Abbildung 49 A](#)). Weibliche ICS-Tiere zeigten im M. soleus eine ähnliche Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ([Abbildung 49 A](#)).



**Abbildung 49:** MuRF1 im M. soleus. (A): Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=6, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016). (B): Relative Expression (qRT-PCR) des MuRF1-Gens im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).



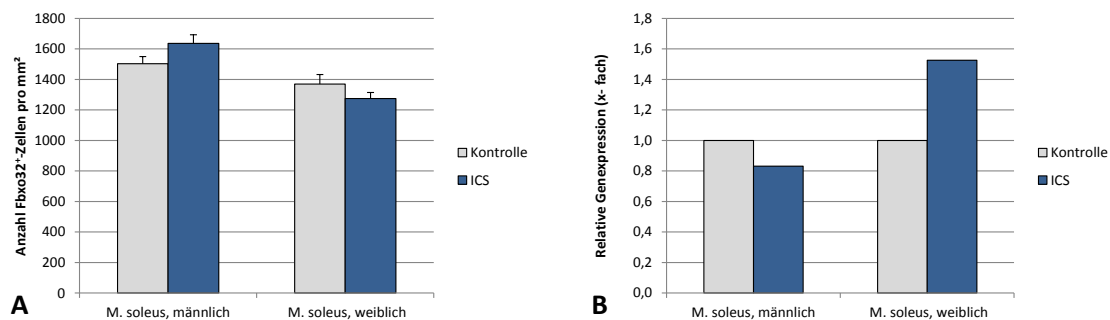
**Abbildung 50:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-MuRF1-Antikörpern (schwarze Pfeile) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): MuRF1-Färbung des M. soleus einer männlichen Kontrolle und (B) Kernfärbung. (C): MuRF1-Färbung des M. soleus einer männlichen ICS-Maus und (D) Kernfärbung. (E): MuRF1-Färbung des M. soleus einer weiblichen Kontrolle und (F) Kernfärbung. (G): MuRF1-Färbung des M. soleus einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kernfärbung. Originalvergrößerung: x200.

### 3.3.5.2 Fbxo32

Als weiterer Atrophie-relevanter Marker wurde Fbxo32 analysiert.

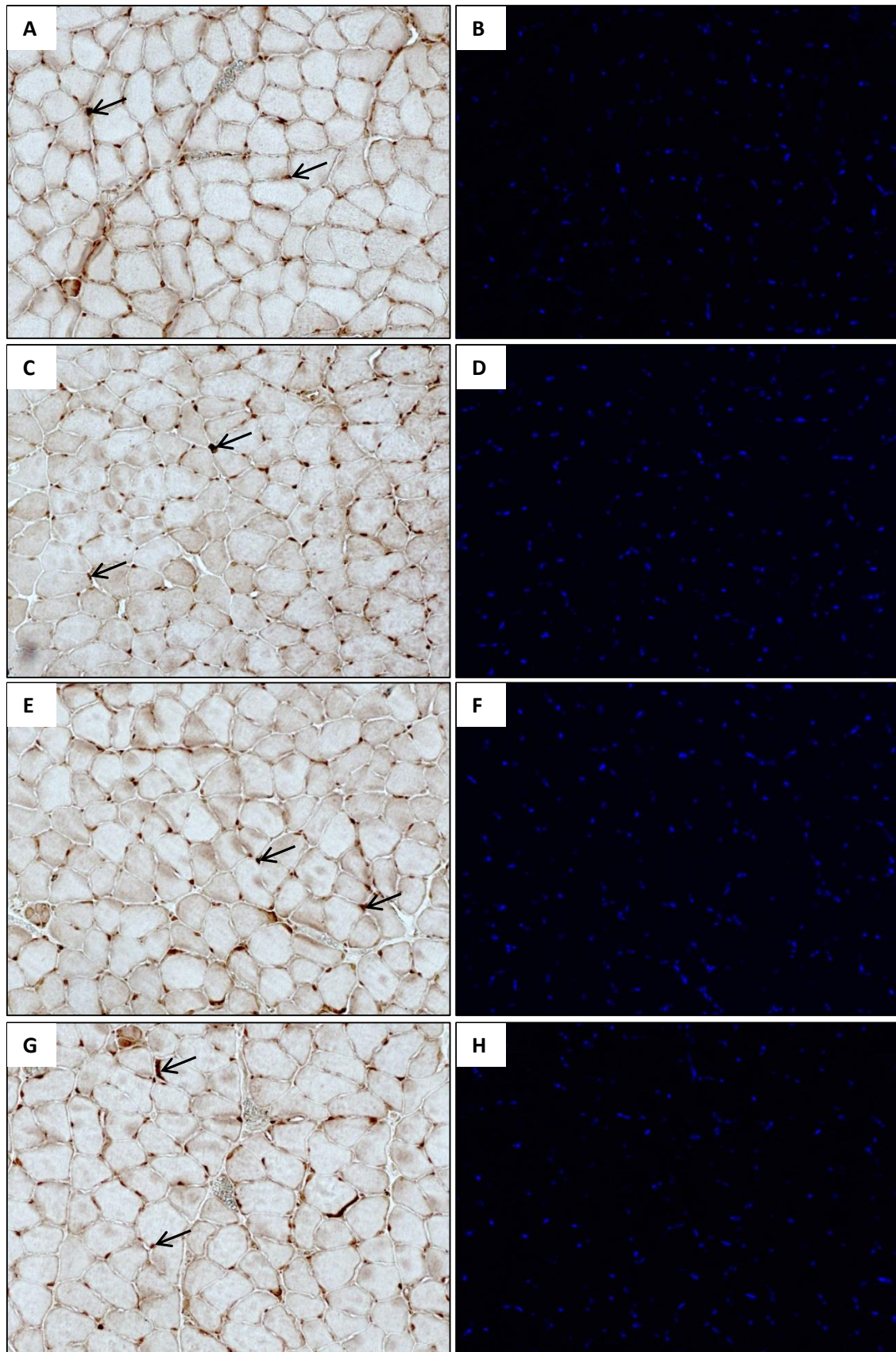
Die relative Expression des Fbxo32-Gens war im M. soleus männlicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle um 20 % vermindert, wohingegen sie im M. soleus weiblicher ICS-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle um 50 % erhöht war ([Abbildung 51 B](#)).

Die immunhistochemische Färbung des M. soleus mit anti-Fbxo32-Antikörpern ([Abbildung 52](#)) zeigte, dass männliche ICS-Tiere ( $1635,6 \pm 56,8$  [n/mm<sup>2</sup>]) im Vergleich zur Kontrolle ( $1502,4 \pm 47,3$  [n/mm<sup>2</sup>]) eine um 8,9 % ( $P = 0,123$ ) erhöhte Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen aufweisen ([Abbildung 51 A](#)). Im M. soleus weiblicher ICS-Tiere ( $1274,9 \pm 38,9$  [n/mm<sup>2</sup>]) zeigt sich eine Abnahme der Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zu der Kontrolle ( $1369,5 \pm 62,4$  n/mm<sup>2</sup>) um 6,9 % ( $P = 0,235$ ) ([Abbildung 51 A](#)).



**Abbildung 51:** Fbxo32 im M. soleus. (A): Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016). (B): Relative Expression (qRT-PCR) des Fbxo32-Gens im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).





**Abbildung 52:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-Fbxo32-Antikörpern (schwarze Pfeile) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): Fbxo32-Färbung des M. soleus einer männlichen Kontrolle und (B) Kernfärbung. (C): Fbxo32-Färbung des M. soleus einer männlichen ICS-Maus und (D) Kernfärbung. (E): Fbxo32-Färbung des M. soleus einer weiblichen Kontrolle und (F) Kernfärbung. (G): Fbxo32-Färbung des M. soleus einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kernfärbung. Originalvergrößerung: x200.



### 3.3.6 Korrelationen zwischen der Dichte an MIF<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>-, IL-1β<sup>+</sup>-, MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. soleus

Auch im M. soleus männlicher ICS-Tiere korrelierte die Dichte (n/mm<sup>2</sup>) inflammatorischer Zellen (MIF<sup>+</sup>) positiv mit der Dichte Atrophie-revanter (MuRF1<sup>+</sup>, Fbxo32<sup>+</sup>) Zellen wie auch mit der Faserdichte (Tabelle 11). Hingegen korrelierte die Dichte CD68<sup>+</sup>-Zellen invers mit der Dichte MuRF<sup>+</sup>-Zellen (Tabelle 11). Die Dichte IL-1β<sup>+</sup>-Zellen männlicher ICS-Tiere im M. soleus korrelierte positiv mit der Dichte MIF<sup>+</sup>- und Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen (Tabelle 11). Zusätzlich korrelierte die Dichte atrophie-revanter Proteine (MuRF1<sup>+</sup>, Fbxo32<sup>+</sup>) männlicher ICS-Mäuse im M. soleus positiv mit der Faserdichte (Tabelle 11). Im M. soleus männlicher ICS-Tiere wurde allerdings keine signifikante inverse Korrelation zwischen inflammatorischen Zellen oder Atrophie-relevanten Proteinen und der Faserquerschnittsfläche gefunden (Tabelle 11).

Die Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. soleus männlicher ICS-Tiere korrelierte positiv mit der Dichte MIF<sup>+</sup>-Zellen bzw. der Faserdichte sowie invers mit der Faserquerschnittsfläche (Tabelle 11).

| M. soleus  |     | MIF <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | CD68 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | MuRF1 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Fbxo32 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Faser-<br>dichte<br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Faserquer-<br>schnittsflä-<br>che (μm <sup>2</sup> ) | Kapillarkontak-<br>te/Muskel-<br>faser (n/Faser) |
|--|-----|--|---|--|---|--|--|--|
| IL-1β <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )           | r   | 0,609                                    | -0,24                                     | 0,453                                      | 0,643                                       | 0,301                                    | -0,254   | 0,0875   |
|  | P < | 0,0273                                   | 0,429                                     | 0,12                                       | 0,0178                                      | 0,318                                    | 0,402  | 0,776  |
| MIF <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )             | r   |  | -0,335                                    | 0,629                                      | 0,554                                       | 0,784                                    | -0,522   | 0,579  |
|  | P < |  | 0,263                                     | 0,0213                                     | 0,0495                                      | 0,00152                                  | 0,0673   | 0,038  |
| CD68 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )            | r   |  |   | -0,578                                     | -0,244                                      | -0,379                                   | -0,21  | -0,164   |
|  | P < |  |   | 0,0386                                     | 0,422                                       | 0,201                                    | 0,491  | 0,592  |
| MuRF1 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )           | R   |  |   |  | 0,517                                       | 0,723                                    | -0,379   | 0,418  |
|  | P < |  |   |  | 0,0707                                      | 0,00526                                  | 0,201  | 0,156  |
| Fbxo32 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )          | r   |  |   |  |   | 0,698                                    | -0,395   | 0,393  |
|  | P < |  |   |  |   | 0,00803                                  | 0,181  | 0,184  |
| Faserdichte<br>(n/mm <sup>2</sup> )                  | r   |  |   |  |   |  | -0,56  | 0,804  |
|  | P < |  |   |  |   |  | 0,0463   | 0,000913   |
| Faserquer-<br>schnittsflä-<br>che (μm <sup>2</sup> ) | r   |  |   |  |   |  |  | -0,587   |
|  | P < |  |   |  |   |  |  | 0,0349   |

**Tabelle 11:** Korrelationen zwischen MIF<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>-, IL-1β<sup>+</sup>-, MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. soleus männlicher ICS-Tiere (Bonaterra et al., 2016).

Im M. soleus weiblicher ICS-Tiere korrelierte die Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen positiv mit der Faserdichte ([Tabelle 12](#)). Es konnten im M. soleus weiblicher ICS-Tiere keine signifikanten Korrelationen zwischen inflammatorischen bzw. atrophie-relevanten Proteinen und der Faserquerschnittsfläche gefunden werden ([Tabelle 12](#)). Die Dichte CD68<sup>+</sup>-Zellen korrelierte jedoch tendentiell invers mit der Faserquerschnittsfläche und positiv mit der Faserdichte ([Tabelle 12](#)).

Die Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. soleus weiblicher ICS-Tiere korrelierte invers mit der Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen bzw. der Faserquerschnittsfläche sowie positiv mit der Faserdichte ([Tabelle 12](#)).

| M. soleus  |     | MIF <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | CD68 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | MuRF1 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Fbxo32 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Faser-<br>dichte<br>(n/mm <sup>2</sup> ) | Faserquer-<br>schnittsflä-<br>che (µm <sup>2</sup> ) | Kapillarkontak-<br>te/Muskelfaser<br>(n/Faser) |
|--|-----|--|---|--|---|--|--|--|
| IL-1β <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )           | r   | 0,00744                                  | 0,319                                     | -0,471                                     | 0,387                                       | 0,449                                    | -0,457   | 0,291  |
|  | P < | 0,977                                    | 0,229                                     | 0,0562                                     | 0,125                                       | 0,0707                                   | 0,0651   | 0,257  |
| MIF <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )             | r   |  | 0,386                                     | 0,171                                      | 0,425                                       | 0,415                                    | -0,258   | -0,0837  |
|  | P < |  | 0,14                                      | 0,511                                      | 0,0891                                      | 0,0974                                   | 0,318  | 0,750  |
| CD68 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )            | r   |  |   | -0,396                                     | 0,428                                       | 0,626                                    | -0,481   | 0,243  |
|  | P < |  |   | 0,129                                      | 0,0985                                      | 0,00945                                  | 0,0593   | 0,365  |
| MuRF1 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )           | r   |  |   |  | -0,228                                      | -0,431                                   | 0,470  | -0,496   |
|  | P < |  |   |  | 0,379                                       | 0,084                                    | 0,0571   | 0,0429   |
| Fbxo32 <sup>+</sup><br>(n/mm <sup>2</sup> )          | r   |  |   |  |   | 0,508                                    | -0,0814  | -0,269   |
|  | P < |  |   |  |   | 0,0373                                   | 0,756  | 0,297  |
| Faser-<br>dichte<br>(n/mm <sup>2</sup> )             | r   |  |   |  |   |  | -0,764   | 0,557  |
|  | P < |  |   |  |   |  | 0,000353   | 0,0203   |
| Faserquer-<br>schnittsflä-<br>che (µm <sup>2</sup> ) | r   |  |   |  |   |  |  | -0,783   |
|  | P < |  |   |  |   |  |  | 0,0002   |

**Tabelle 12:** Korrelationen zwischen MIF<sup>+</sup>-, CD68<sup>+</sup>-, IL-1β<sup>+</sup>-, MuRF1<sup>+</sup>- bzw. Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen, Muskelfaserdichte, Muskel-faserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakte pro Muskelfaser im M. soleus weiblicher ICS-Tiere.

### 3.3.7 Wirkung von ICS auf Apoptose-relevante Marker

Wie im M. gastrocnemius wurde auch im M. soleus der Einfluss von ICS auf Apoptose-relevante Marker untersucht. Hierzu wurden die relativen Expressionen der Bcl-2-, Bax- und Casp3-Gene mittels qRT-PCR bestimmt.

Die relative Expression von Bcl-2 war im M. soleus männlicher bzw. weiblicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle um 30 % bzw. 10 % vermindert ([Anhang C-15](#)). Die relative Expression des Bax-Gens zeigte im M. soleus männlicher ICS-Tiere im Gegensatz zur Kontrolle eine Verminderung um 40 %, wohingegen sie im M. soleus

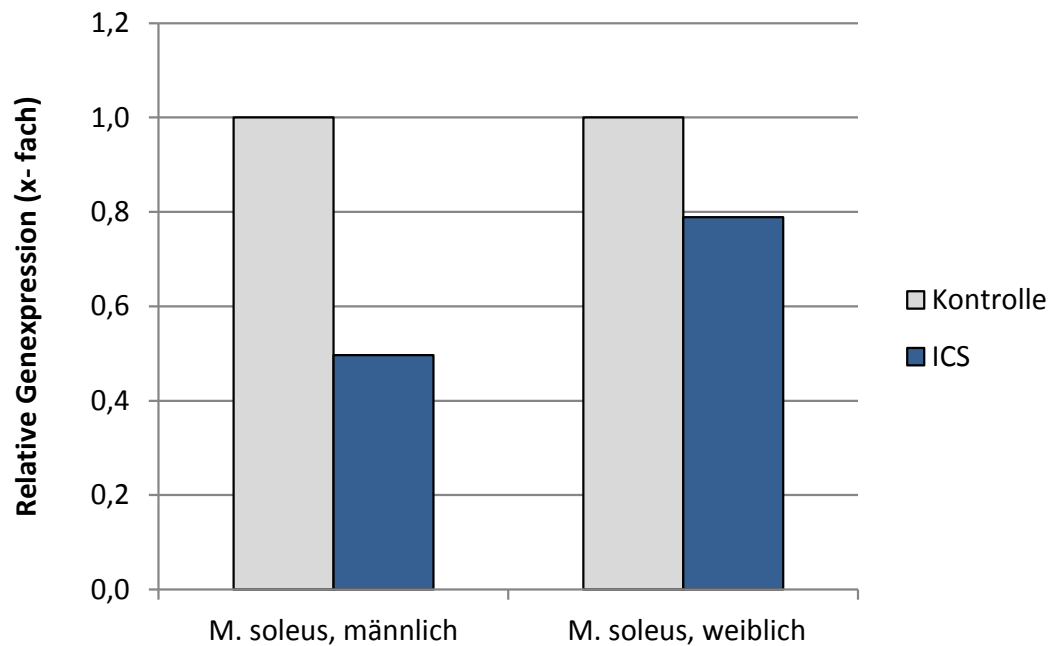
weiblicher ICS-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle um 20 % erhöht war ([Anhang C-15](#)). Die relative Genexpression von Casp3 war im M. soleus männlicher Tiere im Vergleich zur Kontrolle ähnlich, während sie bei weiblichen ICS-Tieren im Vergleich zur Kontrolle um 20 % vermindert war ([Anhang C-15](#)).

### 3.3.8 Einfluss von ICS auf die Innervation

Zur Untersuchung der Wirkung von ICS auf die Innervation des M. soleus wurde die mittlere Anzahl motorischer Endplatten pro Muskelfaser mittels  $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung bestimmt ([Anhang C-16](#)). Weiterhin wurde die Expression nikotinerger Acetylcholinrezeptoren auf RNA-Level durch Bestimmung der relativen Expression des Chrna1-Gens (qRT-PCR) analysiert.

Die relative Expression des Chrna1-Gens war im M. soleus männlicher ICS-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle um 50 % und bei weiblichen ICS-Tieren um 20 % im Vergleich zur Kontrolle vermindert ([Abbildung 53](#)).

Im M. soleus war die mittlere Anzahl motorischer Endplatten pro Muskelfaser weder bei männlichen noch bei weiblichen ICS-Tieren ( $0,01 \pm 0,0$  bzw.  $0,02 \pm 0,0$  [n/Muskelfaser]) gegenüber der jeweiligen Kontrolle ( $0,02 \pm 0,0$  bzw.  $0,03 \pm 0,0$  [n/Muskelfaser]) signifikant unterschiedlich ([Anhang C-17](#)).



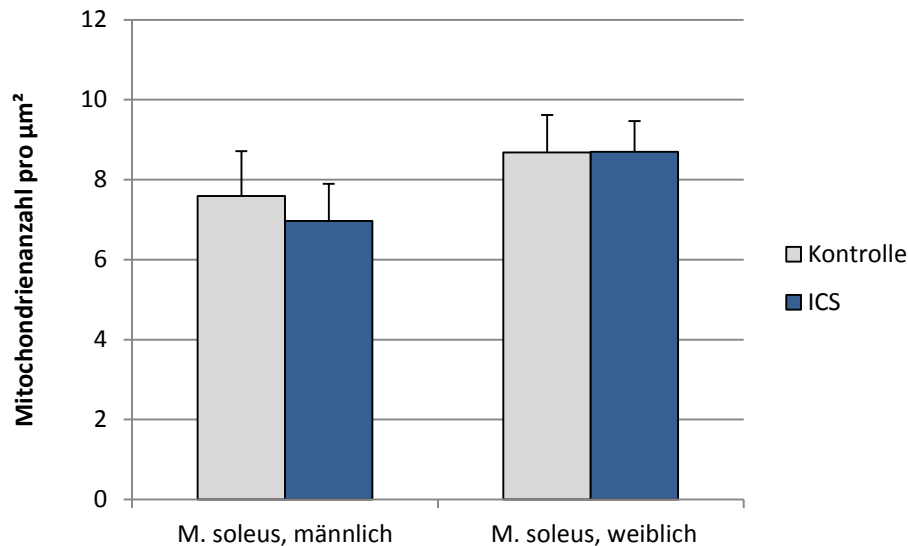
**Abbildung 53:** Relative Expression (qRT-PCR) des Chrna1-Gens im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

### 3.3.9 Analyse der Mitochondrien

#### 3.3.9.1 Untersuchung von Anzahl und Größe der Mitochondrien

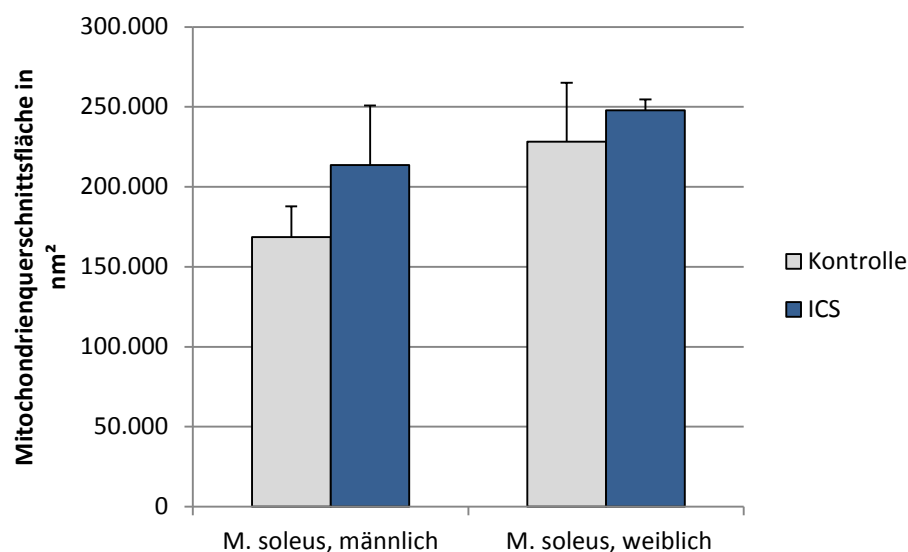
Auch im M. soleus wurden mögliche Veränderungen subzellulärer Strukturen (Mitochondrien) elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei wurden die mittlere Dichte der Mitochondrien ( $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ) und deren mittlere Querschnittsfläche (in  $\text{nm}^2$ ) analysiert.

Die Mitochondriendichte war im M. soleus männlicher ICS-Tiere ( $7,0 \pm 0,9$  [ $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ]) im Vergleich zur Kontrolle ( $7,6 \pm 1,1$  [ $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ]) um 7,9 % ( $P = 0,713$ ) vermindert. Im M. soleus weiblicher ICS Tiere ( $8,7 \pm 0,8$  [ $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ]) zeigte sich die Mitochondriendichte im Vergleich zur Kontrolle ( $8,7 \pm 0,9$  [ $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ]) ähnlich ([Abbildung 54](#)).



**Abbildung 54:** Mitochondriendichte (n/μm²) im M. soleus. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Es wurden pro Gruppe jeweils 5 Tiere ausgewertet (Bonaterra et al., 2016).

Die Untersuchung der mittlerer Mitochondrienquerschnittsfläche (in nm²) im M. soleus zeigte bei männlichen ICS-Tieren (213.691,1 + 37.174,2 [nm²]) eine Zunahme um 26,8 % ( $P = 0,313$ ) im Vergleich zur Kontrolle (168.582,5 + 19.228,7 [nm²]). Hingegen fand sich im M. soleus weiblicher ICS-Tiere (247.831,2 + 6.913,0 [nm²]) eine ähnliche mittlere Mitochondrienfläche (in nm²) im Vergleich zur Kontrolle (228.186,2 + 36.794,6 [nm²]) ([Abbildung 55](#)).

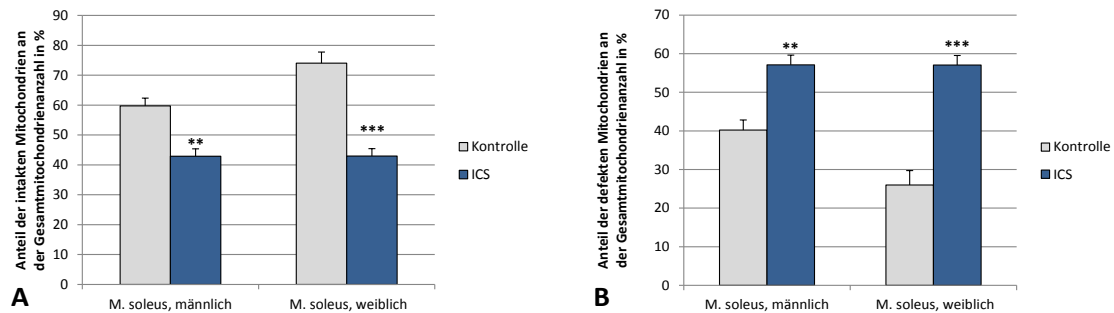


**Abbildung 55:** Mitochondrienquerschnittsfläche (in nm²) im M. soleus. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Es wurden pro Gruppe jeweils 5 Tiere ausgewertet.

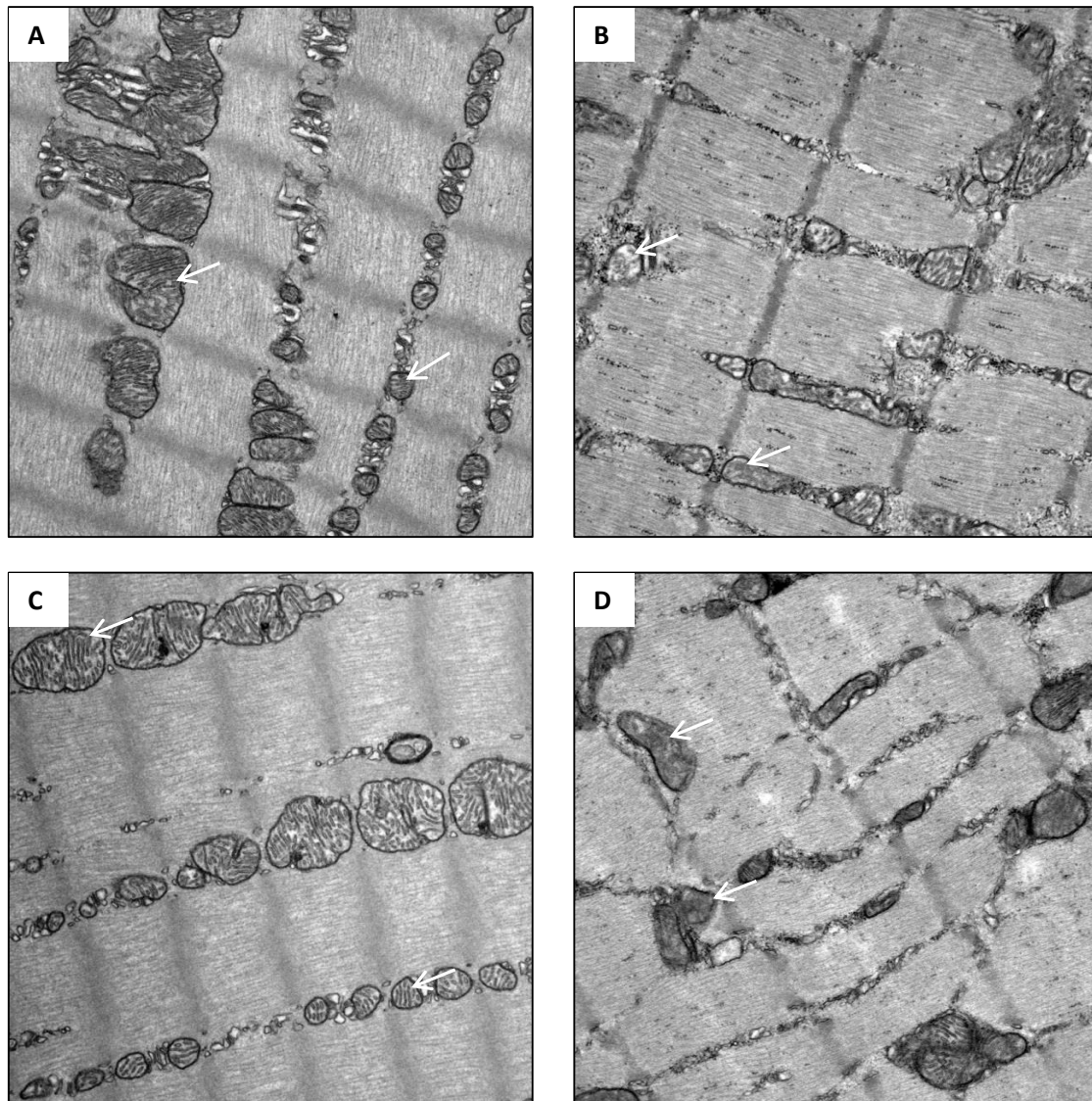
### 3.3.9.2 Bewertung der Morphologie der Mitochondrien

Zusätzlich wurde die Morphologie der Mitochondrien anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen ([Abbildung 57](#)) bewertet. Die Mitochondrien wurden in die Kategorien „intakt“ oder „defekt“ eingeteilt ([Abbildung 21](#)) ([vgl. 2.2.6.3](#)).

Im M. soleus männlicher ICS-Mäuse fanden sich im Mittel eine signifikante ( $P = 0,003$ ) 16,9 %ige Abnahme intakter und eine signifikante ( $P = 0,003$ ) 16,9 %ige Zunahme defekter Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienzahl im Vergleich zur Kontrolle ([Abbildung 56 A+B und Abbildung 57](#)). Ebenso zeigten weibliche ICS-Tiere im M. soleus eine signifikante ( $P < 0,001$ ) Abnahme intakter und eine signifikante ( $P < 0,001$ ) Zunahme defekter Mitochondrien um 31,1 % im Vergleich zur Kontrolle ([Abbildung 56 A+B und Abbildung 57](#)).



**Abbildung 56:** Morphologie der Mitochondrien im M. soleus. (A): Anteil der intakten Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienzahl (in %). (B): Anteil der defekten Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienzahl (in %). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  vs. Kontrolle. Es wurden pro Gruppe jeweils 5 Tiere ausgewertet (Bonaterra et al., 2016).

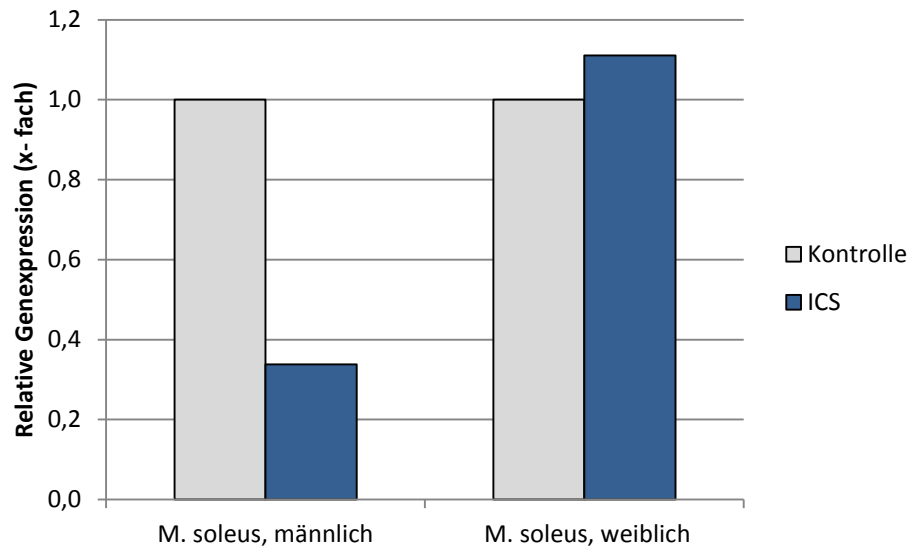


**Abbildung 57:** Exemplarische, elektronenmikroskopische Bilder des M. soleus zur Beurteilung der Morphologie der Mitochondrien (weiße Pfeile). (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D): Weibliche ICS-Maus. Originalvergrößerung: x20.000 (Bonaterra et al., 2016).

### 3.3.9.3 Superoxiddismutase 2 (Sod2)

Weiterhin wurde die relative Expression des Sod2-Gens im M. soleus untersucht:

Diese war im M. soleus männlicher ICS-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle um 70 % reduziert. Bei weiblichen ICS-Tieren war sie um 10 % im Vergleich zur Kontrolle gesteigert ([Abbildung 58](#)).



**Abbildung 58:** Relative Expression (qRT-PCR) des Sod2-Gens im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).



## 4 Diskussion

### 4.1 Intermittierender Kältestress (ICS)-Mausmodell

Das Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von ICS auf mögliche morphologische und molekulare Veränderungen der Skelettmuskulatur (M. gastrocnemius und M. soleus) im Rahmen eines FMS-Tiermodells zu untersuchen und so neue pharmakologische und therapeutische Ansätze zur Behandlung des FMS zu finden. Dazu wurde, wie bereits von anderen Arbeitsgruppen auch (Nishiyori und Ueda, 2008; Nishiyori et al., 2010; Nishiyori et al., 2011), das ICS-Mausmodell beim FMS genutzt. Intermittierender Kältestress im Mausmodell löst bei ICS-Tieren eine langanhaltende mechanische Allodynie und eine thermale Hyperalgesie aus. Diese werden vor allem bei weiblichen Mäusen nachgewiesen (Nishiyori und Ueda, 2008) und durch die Gabe des Antiepileptikums Gabapentin (Nishiyori und Ueda, 2008) bzw. verschiedenen Antidepressiva (Nishiyori et al., 2011) abgemildert. Durch die Verabreichung von Morphinen wird die Ausprägung der durch ICS induzierten Symptome jedoch nicht beeinflusst (Nishiyori et al., 2010). Die Konfrontation eines Organismus mit intermittierendem Kältestress hat einen länger anhaltenden Effekt nach Beendigung der Konfrontation auf die Ausprägung der oben genannten Symptomatik als die Zufuhr von kontinuierlichem Kältestress (Nishiyori und Ueda, 2008; Nishiyori et al., 2010). Da das FMS vor allem bei Frauen auftritt (Wolfe et al., 1995) und als häufige Symptome Muskelschmerzen wechselnder Lokalisation (Häuser et al., 2008) und eine verminderte Schmerzschwelle gegenüber mechanischem Druck, Hitze und Kälte (Kosek et al., 1996; Lautenbacher et al., 1994) zeigt, lag es nahe, das ICS-Mausmodell zur Untersuchung des FMS heranzuziehen (Nishiyori und Ueda, 2008). Außerdem ist die Symptomatik von FMS-Patienten häufig durch übliche Analgetika wie NSAR oder Opioide nicht ausreichend zu beeinflussen (Peng et al., 2015; Sörensen et al., 1995; Rao und Clauw, 2004; Yunus et al., 1989b; Goldenberg et al., 1986), kann jedoch durch die Verabreichung von Gabapentin deutlich verbessert werden (Arnold et al., 2007). Auch dies ist eine deutliche Parallele zwischen FMS und dem ICS-Mausmodell (Nishiyori et al., 2010). Die Überzeugung, dass das verwendete ICS-Modell zur Untersuchung des FMS geeignet ist, wird durch eine kürzlich veröffentlichte Studie zur Evaluation des ICS als FMS-Tiermodell gestützt (Montserrat-de la Paz et al., 2015).

Limitierend in dem in dieser Arbeit vorgestellten Versuchsaufbau ist die Tatsache, dass nach dem Aussetzen der Tiere gegenüber ICS bzw. bei Kontrolltieren keine Untersuchung der Nozizeption durchgeführt worden ist. So kann keine Aussage über die Auswirkung des ICS auf die Schmerzschwelle beispielsweise von Druck oder Hitze gemacht werden. In künftigen Untersuchungen zum ICS-Mausmodell sollten Nozizeptionstests durchgeführt werden.

## 4.2 Faserdichte, Faserfläche und Fasertypkomposition

Im M. gastrocnemius (besteht nur aus Typ IIa-Fasern) männlicher ICS-Tiere konnte eine deutliche Zunahme der Faserdichte (Fasergesamtanzahl/mm<sup>2</sup>) um 22,9 % und eine signifikante Verringerung der mittleren Muskelfaserquerschnittsfläche um 21,6 % im Vergleich zu Kontrolltieren gefunden werden. Im M. soleus (besteht aus Typ I-, IIa-, IIx-Fasern) männlicher ICS-Tiere war die Zunahme der Faserdichte nur gering ausgeprägt (9,4 %). Die Abnahme der mittleren Muskelfaserquerschnittsfläche war jedoch mit einer Abnahme von 33,2 %, wenn nicht zwischen den verschiedenen Fasertypen unterschieden wurde, klar nachweisbar. Sie betraf vor allem die Muskelfaserquerschnittsflächen von Typ IIa- (19,3 %) und Typ IIx-Fasern (22,4 %), wohingegen sie bei Typ I-Fasern nur gering ausgeprägt war (9,4 %). Sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus weiblicher ICS-Tiere konnten weder bezüglich der Faserdichte noch der Muskelfaserquerschnittsfläche Unterschiede zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In der Fasertypkomposition zeigten sich keine Veränderungen zwischen Kontroll- und ICS-Tieren beider Geschlechter und Muskeln.

In einer Studie wurde gefunden, dass Muskelatrophie im Rahmen von Tumorkachexie wie auch Sepsis im glykolytischen M. tibialis anterior stärker als im oxidativen M. soleus ausgeprägt war. Gleichzeitig war jedoch die Expression Atrophie-relevanter Gene im M. soleus höher als im M. tibialis anterior, sodass geschlossen wurde, dass der Peak der Expression Atrophie-relevanter Gene im M. tibialis anterior früher als im M. soleus eingesetzt hat und bei Messung bereits wieder abgeklungen war (Reed et al., 2012).

Die in der hier vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse können diese Studie bestätigen, da ICS die Muskelfaserquerschnittsfläche im M. gastrocnemius männlicher

ICS-Tiere signifikant verringert hat, während sie im M. soleus männlicher ICS-Tiere zum Untersuchungszeitpunkt lediglich nicht signifikant vermindert ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass Muskelatrophie in weiblichen ICS-Tieren verspätet einsetzt ([vgl. 4.5](#)).

In der Literatur gibt es kontroverse Daten bezüglich struktureller Veränderungen in der Muskulatur von FMS-Patienten.

So wurden z.B. keine Unterschiede in der mittleren Faseranzahl pro mm<sup>2</sup> (Bengtsson et al., 1986a) oder in der mittleren Faserfläche nachgewiesen (Bengtsson et al., 1986a; Lindh et al., 1995).

Die Ergebnisse des ICS-Tiermodells stützen allerdings die klinischen Daten einer Studie, die anhand Muskelbiopsien des M. vastus lateralis von weiblichen FMS-Patienten eine erhöhte Variabilität der Fasergrößen und eine veränderte Verteilung der Fasergrößen fand (Srikuea et al., 2013). Eine weitere Publikation dokumentierte ebenfalls im M. quadrizeps femoris und M. deltoideus von FMS-Patienten (27 Frauen und 3 Männer) eine erhöhte Variabilität der Fasergrößen, jedoch auch einen signifikant erhöhten prozentualen Anteil an Typ I-Fasern (Gadallah et al., 2013).

Hingegen konnten in mehreren Studien keine Veränderung in der Muskelfasertypkomposition von FMS-Patienten nachgewiesen werden (Srikuea et al., 2013; Bengtsson et al., 1986a; Drewes et al., 1993; Lindh et al., 1995).

Da in den oben genannten Publikationen Muskelbiopsien des M. vastus lateralis bzw. M. quadrizeps und M. deltoideus vor allem weiblicher FMS-Patienten untersucht wurden, die hier präsentierten Daten ähnliche Veränderungen besonders aber im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher ICS-Mäuse nachweisen, liegt es nahe zu vermuten, dass entweder die verschiedenen Skelettmuskeln unterschiedlich reagieren oder die Muskulatur der weiblichen ICS-Mäuse zeitverzögert im Vergleich zu männlichen Mäusen durch ICS betroffen ist.

Gleichwohl stimmt die ausgeprägte Abnahme der Muskelfaserquerschnittsfläche vor allem der Typ II-Fasern im ICS-Modell mit Daten von FMS-Patienten überein, die eine Atrophie der Typ II-Fasern in verschiedenen Muskelregionen zeigen (Kalyan-Raman et al., 1984, Yunus et al., 1986). Ein Zusammenhang zwischen einer veränderte Verteilung

der Muskelfasergröße bei FMS-Patienten und Fatigue nach Belastung wird vermutet (Srikuea et al., 2013).

### 4.3 Angiogenese

Um die Sauerstoffversorgung der Muskulatur in ICS- und Kontrolltieren zu untersuchen, wurde die mittlere Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser und die mittlere Kapillardichte (Kapillargesamtanzahl/mm<sup>2</sup>) ermittelt.

Hier konnte bei männlichen ICS-Tieren sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus eine signifikante Abnahme der Kapillarkontakte pro Muskelfaser um 12,5 % bzw. 11,8 % im Vergleich zu Kontrolltieren gefunden werden. Im M. soleus waren hiervon vor allem die Typ I- und IIa-Muskelfasern betroffen. Zwischen weiblichen ICS- und Kontrolltieren waren hingegen keine Unterschiede in der mittleren Anzahl der Kapillarkontakte vorhanden. Die mittlere Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser ist im M. soleus zweimal höher als im M. gastrocnemius.

In keinem der beiden Muskeln beider Geschlechter wurde eine Beeinflussung der Kapillardichte durch ICS gefunden.

Die mit Hilfe der qRT-PCR untersuchten Angiogenese-relevanten Marker zeigten bei männlichen ICS-Tieren eine deutliche Abnahme der relativen Genexpression von Vegfa, Vegfb, Notch1 und Notch3 sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus. Diese Ergebnisse passen zu der gefundenen verminderten Anzahl an Kapillarkontakten pro Muskelfaser bei männlichen ICS-Tieren. Außerdem zeigte sich eine Reduktion der Socs3-Genexpression, die vor allem im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher ICS-Tiere existierte.

Die hier vorgestellten Ergebnisse erweitern die Daten einer klinischen Studie, die verminderte Vegf-Konzentrationen im Plasma von FMS-Patientinnen nachweisen konnte (Blanco et al., 2010). Die verminderte Kapillarisation sowohl des M. gastrocnemius wie auch des M. soleus mit konsekutiver Sauerstoff-Unterversorgung des Muskelgewebes männlicher ICS-Tiere könnte verantwortlich sein für die verminderte relative Expression des Socs3-Gens vor allem in der Skelettmuskulatur männlicher ICS-Tiere, da gezeigt werden konnte, dass Hypoxie die Socs3-mRNA-Level

vermindert (Yokogami et al., 2013). Durch die verminderte Socs3-Genexpression könnte reaktiv der hemmende Einfluss von Socs3 auf die Angiogenese reduziert werden.

Die gefundene ICS-induzierte Verminderung der Kapillarkontakte pro Muskelfaser kann klinische Daten stützen, die ebenfalls eine verringerte Kapillaranzahl pro Muskelfaser bei FMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden haben (Srikuea et al., 2013; Lindh et al., 1995). Zudem wurde gezeigt, dass die mittlere Faserfläche (in  $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ ) in Relation zu den Kapillaren um jede Muskelfaser bei FMS-Patienten signifikant ansteigt (Lindh et al., 1995).

Andererseits wurde jedoch auch beschrieben, dass keine Verringerung der mittleren Kapillaranzahl pro Muskelfaser in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten existiert (Bengtsson et al., 1986a).

Weiterhin wurden morphologische Veränderungen von Kapillaren in der Muskulatur von FMS-Patienten gefunden, die ein vergrößertes Lumen, ein verdicktes Endothel und eine verbreiterte Basallamina beinhalteten. Es wurde vermutet, dass diese Veränderungen durch eine gestörte Mikrozirkulation in der Muskulatur verursacht werden (Lindman et al., 1995).

Neben der morphologischen Untersuchung der Kapillarisierung der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten wurden in weiteren Studien der Sauerstoffgehalt wie auch der Blutfluss in der Muskulatur von FMS-Patienten untersucht: So wurde z.B. ein verminderter subkutaner und intramuskulärer Sauerstoffpartialdruck gefunden (Lund et al., 1986). Auch wurde aufgezeigt, dass in der Muskulatur von FMS-Patienten sowohl die Stärke des Blutflusses als auch dessen Dauer gegenüber Kontrollen nach standardisierter dynamischer Arbeit wie auch während statischer Muskelkontraktion signifikant verringert sind (Elvin et al., 2006). Andere konnten ebenfalls zeigen, dass der muskuläre Blutfluss nach aerober Muskelarbeit bei Patienten signifikant verringert ist (McIver et al., 2006). Ferner war bei FMS-Patienten die relative Sauerstoffextraktionsfraktion während Muskelarbeit wie auch die Regenerationszeit des  $\text{HbO}_2$  und des Hb nach der Muskelarbeit verlängert (Shang et al., 2012). Aber auch hier existieren kontroverse Befunde: So findet sich auch ein Bericht über eine verstärkte Muskeldurchblutung bei Fibromyalgie-Patienten, die jedoch nicht signifikant

ist (Klemp et al., 1982). In einer anderen Untersuchung wurde bei FMS-Patienten während aerober körperlicher Anstrengung kein Unterschied in der maximalen Sauerstoffaufnahme ( $\text{VO}_2\text{max}$ ) gegenüber gesunden Kontrollen gefunden (Simms et al., 1994). Weiterhin präsentierte sich eine signifikant gesteigerte Innervation arteriovenöser Shunts in der Haut des Hypothenars. Diese betraf vor allem vasodilatorisch wirkende sensorische Fasern im Vergleich zur vasokonstriktorisch wirkenden sympathischen Innervation (Albrecht et al., 2013). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch einen dysregulierten Blutfluss ein ausgedehnter tiefer Gewebesmerz und Fatigue in FMS-Patienten begünstigt werden könnten (Albrecht et al., 2013).

Zusammenfassend gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass in der Muskulatur von FMS-Patienten eine Veränderung bzw. Dysregulation der Mikrozirkulation mit konsekutiv verminderter Sauerstoffversorgung der Muskulatur existiert. Es zeigen sich sowohl numerische wie auch morphologische Veränderungen der Kapillaren. Die verminderte Kapillaranzahl pro Muskelfaser konnte ebenfalls in männlichen ICS-Tieren nachgewiesen werden. Eine Untersuchung morphologischer Veränderungen von Kapillaren in ICS-Tieren sollte in künftigen Untersuchungen berücksichtigt werden, um eventuell weitere Parallelen zwischen FMS-Patienten und ICS-Tieren ziehen zu können.

Auch die hier vorgestellten Daten weisen darauf hin, dass ICS die Verteilung von Sauerstoff, Nährstoffen und Hormonen hin zu den Muskelfasern und ebenso die Aufnahme und den Abtransport von Stoffwechselprodukten zu exkretorischen Organen reduziert.

Der M. soleus scheint durch die stärkere Kapillarisation zweimal besser vor dieser Schädigung geschützt zu sein. Vor allem in Skelettmuskeln, die aus Typ II-Fasern bestehen, dürfte eine Verschlechterung der Mikrozirkulation zu einer verminderten Sauerstoffversorgung und einer geringeren Ausscheidung von Stoffwechselprodukten führen. Dies könnte direkt zu einer pathologischen Verteilung von Gewebesauerstoff, Schmerzen und Fatigue in FMS-Patienten beitragen (Srikuea et al., 2013; Lund et al., 1986). Die in der hier präsentierten Arbeit gefundene verminderte Anzahl an Kapillarkontakten pro Muskelfaser in Zusammenschau mit der verringerten Muskelfaserquerschnittsfläche könnte die Fatigue nach Belastung, die in der Literatur beschrieben wird (Srikuea et al., 2013), erklären.

## 4.4 Inflammation

### 4.4.1 IL-1 $\beta$

Weiterhin vermuteten wir, dass inflammatorische Prozesse auf Grund einer Infiltration des Muskelgewebes durch entzündungsfördernde Zellen für die verminderte Muskelfaserquerschnittsfläche mitverantwortlich sein könnten. Es existieren bereits zahlreiche Publikationen zum veränderten Zytokinlevel bei FMS-Patienten, die in dem Übersichtsartikel von Uçeyler et al. sehr gut bewertet und zusammengefasst sind (Uçeyler et al., 2011): hier wird die Studienlage anhand der verschiedenen Zytokinlevel im Serum, im Plasma, im Vollblut und in der Haut von FMS-Patienten beurteilt.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Dichte der IL-1 $\beta^+$ -, COX-2 $^+$ -, MIF $^+$ - und CD68 $^+$ -Zellen im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher bzw. weiblicher ICS-Tiere und deren Kontrollen untersucht. Ferner wurde die relative Expression der IL-1 $\beta$ -, COX-2-, MIF-, CD68-, IL-6- und TNF-Gene in den oben genannten Muskeln beurteilt.

Zwischen der Dichte IL-1 $\beta^+$ -Zellen im M. soleus und M. gastrocnemius männlicher bzw. weiblicher ICS-Tiere existierten keine deutlichen Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen.

Eine Studie untersuchte mit Hilfe der Mikrodialysetechnik die IL-1 $\beta$ -Konzentration im M. vastus lateralis vor, während und nach 20-minütig wiederholten dynamischen Kontraktionen. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den IL-1 $\beta$ -Leveln von FMS-Patienten und Kontrollen gefunden werden, sodass davon ausgegangen wurde, dass das Zytokin IL-1 $\beta$  keine wichtige Rolle in der Entstehung des FMS spielt (Christidis et al., 2015). Dies bestätigen auch in der Literatur beschriebene Befunde, die keinen Unterschied in der Serum- bzw. Plasma-Konzentration von IL-1 $\beta$ /IL-1 zwischen FMS-Patienten und gesunden Kontrollen zeigen (Pay et al., 2000; Wallace et al., 2001; Gür et al., 2002; Christidis et al., 2015). Allerdings fand eine Studie verminderte Serum-IL-1 $\beta$ -Konzentrationen in FMS-Patienten im Vergleich zur Kontrolle (Kosek et al., 2015). Hingegen konnte gezeigt werden, dass in Hautproben von FMS-Patienten die Expression (RT-PCR und Immunhistochemie) von IL-1 $\beta$  detektiert werden konnte, wohingegen dieses Zytokin in Kontrollen unter der Nachweisgrenze lag (Salemi et al., 2003).

Hier ergänzen die im ICS-Mausmodell erhobenen Ergebnisse die Befunde bei FMS-Patienten, die ebenfalls keinen Unterschied in den IL-1 $\beta$ -Leveln im M. vastus lateralis von FMS-Patienten und Kontrollen finden konnten (Christidis et al., 2015). Sie stehen jedoch im Widerspruch zu den erhöhten IL-1 $\beta$ -Leveln in der Haut von FMS-Patienten (Salemi et al., 2003). Da es sich jedoch bei den untersuchten Proben um unterschiedliche Gewebearten handelt, können hier keine direkten Vergleiche gezogen werden.

#### **4.4.2 COX-2**

Im M. soleus weiblicher ICS-Tiere konnte eine um 13,2 % signifikant verringerte Dichte an COX-2<sup>+</sup>-Zellen gefunden werden. Im M. gastrocnemius beider Geschlechter wie auch im M. soleus männlicher ICS-Tiere zeigten sich hingegen keine deutlichen Unterschiede zwischen ICS-Tieren und jeweiligen Kontrollen. Zu diesem inflammatorischen Zytokin existieren im Zusammenhang mit FMS in der Literatur bisher keine Daten.

Auf Grund dieser Datenlage liegt die Vermutung nahe, dass die COX-2-Expression für die Beschwerdesymptomatik bzw. die verminderte Muskelfaserquerschnittsfläche im ICS-Tiermodell eine untergeordnete Rolle spielt.

#### **4.4.3 MIF**

Es zeigte sich lediglich ein leichter Anstieg der Dichte von MIF<sup>+</sup>-Zellen im M. gastrocnemius bzw. M. soleus männlicher ICS-Tiere um 8,6 % bzw. 11,7 % im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser konnte in weiblichen ICS-Tieren jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Anzahl MIF<sup>+</sup>-Zellen im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere korrelierte invers signifikant mit der Faserquerschnittsfläche und positiv mit der Faserdichte ([vgl. 4.7](#)). Zu diesem inflammatorischen Zytokin existieren im Zusammenhang mit FMS in der Literatur bisher keine Daten.



#### 4.4.4 CD68

Sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus männlicher ICS-Tiere konnte eine deutliche, aber nicht signifikante Dichtezunahme CD68<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe um 76,8 % bzw. 42,6 % gefunden werden. Diese war bei den weiblichen ICS-Tieren sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus mit 9,1 % bzw. 20,7 % deutlich geringer ausgeprägt. Diese an Mäusen erhobenen Daten könnten somit Untersuchungen ergänzen, die ebenfalls mehr CD68<sup>+</sup>-Makrophagen in der Skelettmuskulatur des M. biceps brachii von FMS-Patienten im Vergleich zu Gesunden nachweisen konnten (Rüster et al., 2005). Allerdings zeigt eine ältere Studie im M. quadrizeps femoris von FMS-Patienten keine inflammatorische Myopathie oder eine Infiltration von Makrophagen (Drewes et al., 1993). Auch eine neuere Untersuchung am M. vastus lateralis ergab keine Zellinfiltration oder andere Zeichen der Entzündung in der Muskulatur von FMS-Patienten (Srikuea et al., 2013). In einer weiteren Studie konnte keine erhöhte Anzahl von Makrophagen in der Haut von FMS-Patienten nachgewiesen werden (Uçeyler et al., 2013).

Deshalb kann angenommen werden, dass beim FMS-Syndrom die Invasion von CD68<sup>+</sup>-Zellen auf die Muskulatur beschränkt ist und beispielsweise in der Haut von FMS-Patienten nicht zu finden ist. Jedoch wurden in der oben genannten Literatur jeweils verschiedene Skelettmuskeln untersucht, sodass kein abschließender Vergleich zwischen den Studien gezogen werden kann.

Eine Limitierung der hier vorgestellten Ergebnissen stellt ebenfalls die Tatsache dar, dass der Dichteanstieg CD68<sup>+</sup>-Zellen, der v.a. im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere nachgewiesen werden konnte, nur tendentiell, aber nicht signifikant war. Es empfiehlt sich, in kommenden Untersuchungen zum ICS-Mausmodell besonders den M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere zu untersuchen und eine größere Tieranzahl zu nutzen.

#### 4.4.5 IL-6

Ferner wurde die IL-6-Genexpression im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher wie weiblicher ICS-Tiere und entsprechender Kontrollen untersucht.

Die relative Genexpression des IL-6-Gens war im M. gastrocnemius bei männlichen bzw. weiblichen ICS-Tieren um 60 % bzw. um 190 % höher als bei der Kontrolle. Im M. soleus zeigte sich bei männlichen ICS-Tieren eine Verminderung der relativen IL-6-Genexpression um 60 %, bei weiblichen ICS-Tieren eine um 80 % erhöhte relative IL-6-Genexpression.

In kürzlich erschienenen Studien konnte gezeigt werden, dass im Serum von FMS-Patienten höhere Level an IL-6 existieren (Iannuccelli et al., 2010; Hernandez et al., 2010). Allerdings gibt es auch Studien, die belegen, dass es zwischen FMS-Patienten und Kontrollen keine Unterschiede in der Serum- (Wallace et al., 2001; Gür et al., 2002; Wang et al., 2008a; Pay et al., 2000; Maes et al., 1999) bzw. Plasma-IL-6-Konzentration (Christidis et al., 2015) gibt. Obwohl in der Literatur mehr Studien existieren, die zwischen FMS-Patienten und Kontrollen keinen Unterschied in der Serum-IL-6-Konzentration beschreiben, gehen Uçeyler et al. (Uçeyler et al., 2011) eher davon aus, dass FMS-Patienten eine erhöhte Serum-IL-6-Konzentration besitzen, da diese Studien im Gegensatz zu den Studien, in denen kein Unterschied gefunden wurde, eine höhere methodische Qualität besitzen. In einer Studie am M. vastus lateralis von FMS-Patienten mittels Mikrodialysetechnik konnten keine Unterschiede im IL-6-Level von FMS-Patienten und Kontrollen gefunden werden (Christidis et al., 2015). In Hautproben von FMS-Patienten konnte jedoch die Expression (RT-PCR und Immunhistochemie) von IL-6 detektiert werden, wohingegen dieses Zytokin in Kontrollen unter der Nachweisgrenze lag (Salemi et al., 2003). Die im ICS-Mausmodell erhobenen Ergebnisse ergänzen die Befunde dieser Studie, da im M. gastrocnemius von ICS-Tieren beider Geschlechter eine erhöhte IL-6-Genexpression nachgewiesen werden konnte. Ferner könnte vermutet werden, dass die IL-6-Genexpression in unterschiedlichen Skelettmuskeln verschieden ausgeprägt ist. Die Untersuchungen von Christidis et al. (Christidis et al., 2015) wurden mittels Mikrodialysetechnik bei FMS Patienten erhoben, sodass die Ergebnisse des hier vorgestellten ICS-Mausmodells nur schwer mit diesen vergleichbar sind.

Allerdings können erhöhte IL-6-Level zur Atrophie der Skelettmuskulatur führen (Haddad et al., 2005). Es wird hypothetisiert, dass moderate IL-6-Level über eine kurze Zeitdauer keine proatrophischen Effekte auslösen, während persistierende und systemisch erhöhte IL-6-Level gegebenenfalls notwendig für die Induktion kataboler

Effekte und Muskelschwund, möglicherweise mit Hilfe weiterer Mediatoren, sind (Muñoz-Cánoves et al., 2013). In Zusammenschau der hier vorgestellten Ergebnisse könnten erhöhte IL-6-Werte für die Entwicklung der Beschwerdesymptomatik und für eine verminderte Muskelfaserquerschnittsfläche im ICS-Modell mitverantwortlich sein. In künftigen Studien mittels ICS-Tiermodell sollte daher der IL-6-Proteingehalt z.B. mittels immunhistologischer Färbungen bzw. Western Blot nachgewiesen werden.

#### **4.4.6 TNF**

Die TNF-Genexpression war bei männlichen ICS-Tieren im M. gastrocnemius um 90 % gesteigert, wohingegen sie bei weiblichen ICS-Tieren um 60 % vermindert war. Im M. soleus war die Genexpression bei männlichen/weiblichen ICS-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlich.

In FMS-Patienten wurden eine signifikant erhöhte TNF-alpha-Konzentration im Serum (Cordero et al., 2013; Wang et al., 2008a) und eine signifikant erhöhte TNF-alpha-Expression in mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden. Die Serum-TNF-alpha-Konzentration korrelierte negativ mit der Coenzym Q10-Konzentration in PBMCs und positiv mit der Höhe von mitochondrialen ROS. Sowohl die Serum-TNF-alpha-Konzentration wie auch die TNF-alpha-mRNA-Expression korrelierten positiv mit den Schmerzangaben der Patienten (Cordero et al., 2013). Außerdem wurde gefunden, dass in Hautproben von FMS-Patienten die Expression (RT-PCR und Immunhistochemie) von TNF detektiert werden konnte, wohingegen dieses Zytokin in Kontrollen unter der Nachweisgrenze lag (Salemi et al., 2003). Jedoch existieren auch Studien, die keine erhöhten Serum- bzw. Plasma-TNF-Level in FMS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen fanden (Wallace et al., 2001; Uçeyler et al., 2006; Christidis et al., 2015). In einer weiteren Studie an FMS-Patienten wurde die TNF-Konzentration im M. vastus lateralis von FMS-Patienten vor, während und nach 20-minütig wiederholten dynamischen Kontraktionen mittels Mikrodialysetechnik gemessen. In Kontrollen konnte vor den Kontraktionen ein signifikant höheres TNF-Level gemessen werden als in den FMS-Patienten. Außerdem stieg in Kontrollen das TNF-Level im Vergleich zu den FMS-Patienten signifikant an (Christidis et al., 2015).

In Berücksichtigung der Tatsache, dass ICS vor allem den M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere zu affektieren scheint, können auch im ICS-Tiermodell eine gesteigerte TNF-Genexpression nachgewiesen werden und somit in der Literatur gefundene Ergebnisse gestützt werden. Allerdings werden die erhobenen Daten dadurch limitiert, dass nur die TNF-Genexpression gemessen wurde. In künftigen Untersuchungen zum ICS-Tiermodell sollte auch der TNF-Proteingehalt, bevorzugt im M. gastrocnemius männlicher Tiere, gemessen werden, um eine klarere Aussage bezüglich der Rolle von TNF an der Entstehung des FMS treffen zu können.

Die Untersuchungen von Christidis et al. (Christidis et al., 2015) scheinen im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnissen zu stehen. Dies kann zum einen darauf zurückzuführen sein, dass ein anderer Skelettmuskel mittels einer anderen Technik untersucht wurde bzw. zum anderen die Befunde von Patienten stammen, sodass diese Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind.

Die in der hier vorgestellten Arbeit präsentierten Ergebnisse lassen vermuten, dass erhöhte TNF-Level zur Entstehung der Symptomatik im ICS-Tiermodell beitragen könnten. Ferner könnten erhöhte TNF-Level auch zu einer verminderten Muskelfaserquerschnittsfläche führen, da in der Literatur bereits beschrieben wurde, dass TNF in der Skelettmuskulatur zu Muskelatrophie (Reid und Li, 2001; Li et al., 2003; Larichaudy et al., 2012) und verstärkter Glykolyse (Remels et al., 2015) führt. Ferner ist es ein Regulator von Myogenese und Muskelregeneration (Chen et al., 2007) und inhibiert die Myoblastendifferenzierung (Meyer et al., 2015).

#### **4.5 Atrophie und Apoptose**

Für Atrophievorgänge in der Skelett- und Herzmuskulatur spielen die beiden E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF1 und Fbxo32 eine bedeutende Rolle. Sie sind in der Skelettmuskulatur in Ruhe auf relativ geringem Level exprimiert. Ihre Expression steigt allerdings schnell nach dem Einsetzen verschiedener Stressoren und vor dem Einsetzen von Muskelverlust an (Bodine und Baehr, 2014). Muskelatrophie in der Skelettmuskulatur hängt eng mit apoptotischen Vorgängen zusammen. So führt eine reduzierte PI3K-Aktivität über Apoptose und das Ubiquitin-Proteasom-System zu Muskelatrophie (Lee et al., 2004).

Es konnte eine 14,7 %ige Zunahme der Dichte an MuRF1<sup>+</sup>- und eine signifikante 17,7 %ige Zunahme der Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden. Auch im M. soleus männlicher ICS-Tiere nimmt die Dichte an MuRF1<sup>+</sup>- und Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen um 29,7 % bzw. 8,9 % zu. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Ligasen mitverantwortlich für die Verminderung der mittleren Faserquerschnittsfläche männlicher ICS-Mäuse sind. Auffällig sind weiterhin die gegenüber der Kontrolle erhöhten relativen Expressionen der MuRF1- und Fbxo32-Gene im M. gastrocnemius und M. soleus weiblicher ICS-Tiere ohne eine Zunahme der Dichte an MuRF1<sup>+</sup>- und Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Kälte-induzierten Atrophieprozesse in weiblichen Tieren erst später einsetzen und deshalb (noch) keine Zunahme der Dichte MuRF1<sup>+</sup>- wie auch Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen wie auch noch keine Verminderung der mittleren Faserquerschnittsfläche nachweisbar sind. Diese Ergebnisse zeigen, dass ICS proteolytische Prozesse in der Skelettmuskulatur via MuRF1 und Fbxo32 fördert und stehen im Einklang mit Befunden bei Ratten, bei der die Tiere für mehrere Stunden bei 4°C gehalten wurden (Manfredi et al., 2013).

Hingegen konnten sowohl im M. gastrocnemius als auch M. soleus männlicher wie auch weiblicher ICS-Tiere keine relevante Erhöhung der relativen Genexpression pro-apoptotischer Marker (Bax, Casp3) gefunden und allenfalls eine leichte Verminderung der relativen Genexpression des anti-apoptotischen Bcl-2 im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher und im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere nachgewiesen werden. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die durch ICS verminderte Faserquerschnittsfläche nicht durch apoptotische Vorgänge in der Skelettmuskulatur ausgelöst wurden. Die hier beschriebenen tierexperimentell erhobenen Ergebnisse sind damit im Einklang mit klinischen Daten von FMS-Patienten, deren Skelettmuskulatur in elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine typischen Zeichen von Apoptose aufwies (Spratt et al., 2004). Allerdings konnten in einer weiteren Studie signifikant erhöhte Serum-Level an Anti-Annexin V-Antikörpern, die mit apoptischen Vorgängen assoziiert sein können, bei FMS-Patienten nachgewiesen werden (Gheita et al., 2013).

## 4.6 Innervation

Da eine geringere mittlere Muskelfaserquerschnittsfläche im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher ICS-Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden konnte und Hypothesen existieren, dass die Symptomatik des FMS durch eine Veränderung der motorischen Endplatten hervorgerufen werden könnte (Bazzichi et al., 2009), wurde die Innervation der Skelettmuskulatur mit Hilfe einer  $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung untersucht. Jedoch konnten weder bei männlichen noch bei weiblichen Mäusen sichtbare Veränderungen oder eine Differenz in der Anzahl motorischer Endplatten pro Muskelfaser (Innervation) in den beiden untersuchten Skelettmuskeln gefunden werden. Lediglich die relative Expression des *Chrna1*-Gens war in beiden Geschlechtern, sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus, reduziert. Diese Daten lassen vermuten, dass Veränderungen der Innervation der Muskulatur durch motorische Endplatten in ICS-Mäusen und FMS-Patienten eher eine untergeordnete Rolle spielen.

## 4.7 Korrelationen zwischen der Dichte an $\text{MIF}^+$ -, $\text{CD68}^+$ -, $\text{IL-1}\beta^+$ -, $\text{MuRF1}^+$ - bzw. $\text{Fbxo32}^+$ -Zellen, Muskelfaserdichte, Muskelfaserquerschnittsfläche oder Kapillarkontakten

Die hier präsentierten Daten zeigen zum ersten Mal, dass im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere die Dichte inflammatorischer Zellen ( $\text{IL-1}\beta^+$ ,  $\text{MIF}^+$ ) positiv mit der Dichte von Zellen, die Atrophie-relevante Proteine exprimieren ( $\text{MuRF1}^+$ ,  $\text{Fbxo32}^+$ ) und der Faserdichte korrelieren. Außerdem korrelierte die Dichte inflammatorischer Zellen ( $\text{IL-1}\beta^+$ ,  $\text{MIF}^+$ ,  $\text{CD68}^+$ ) invers mit der Faserquerschnittsfläche. Die Dichte der Zellen, die Atrophie-relevante Proteine exprimieren ( $\text{MuRF1}^+$ ,  $\text{Fbxo32}^+$ ), korrelierte positiv mit der Faserdichte und invers mit der Faserquerschnittsfläche.

Die Korrelationen zwischen den o.g. Parametern stimmen mit entsprechenden Korrelationen zwischen diesen Parametern bzgl. M. soleus männlicher ICS-Tiere überein. Allerdings korrelierte im M. soleus die Dichte inflammatorischer Zellen ( $\text{IL-1}\beta^+$ ,  $\text{MIF}^+$ ) und die der Zellen, die Atrophie-relevante Proteine exprimieren ( $\text{MuRF1}^+$ ,  $\text{Fbxo32}^+$ ), nicht signifikant invers mit der Faserquerschnittsfläche.

Die Faserdichte im M. soleus männlicher ICS-Tiere korrelierte invers mit der Faserquerschnittsfläche, sowie positiv mit der Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser. Auch die Faserquerschnittsfläche korrelierte invers mit der Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser.

Im M. gastrocnemius weiblicher ICS-Tiere korrelierte die Dichte an IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen positiv mit der Faserdichte und ebenfalls positiv mit der Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser. Die Dichte MIF<sup>+</sup>-Zellen korrelierte hingegen positiv mit der Dichte an Zellen, die Atrophie-relevante Proteine (MuRF1<sup>+</sup>, Fbxo32<sup>+</sup>) exprimieren wie auch mit der Faserdichte. Die Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen korrelierte ihrerseits positiv mit der Faserdichte und invers mit der Faserquerschnittsfläche. Die Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen korrelierte positiv mit der Faserdichte und der Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser.

Im M. soleus weiblicher ICS-Tiere konnte eine inverse Korrelation der Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen mit der Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser nachgewiesen werden. Außerdem korrelierte die Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen positiv mit der Faserdichte. Die Faserdichte korrelierte negativ mit der Faserquerschnittsfläche und positiv mit der Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser. Die Faserquerschnittsfläche korrelierte invers mit der Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser. Es konnten im M. soleus weiblicher ICS-Tiere keine signifikanten Korrelationen zwischen inflammatorischen bzw. Atrophie-relevanten Proteinen und der Faserquerschnittsfläche gefunden werden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass in der Skelettmuskulatur männlicher ICS-Tiere vor allem im M. gastrocnemius proinflammatorische und/oder Atrophie-relevante Proteine mit der Regulation der Faserdichte und/oder der Muskelfaserquerschnittsfläche verknüpft sind. Außerdem legt die fehlende signifikante Korrelation zwischen proinflammatorischen bzw. Atrophie-relevanten Proteinen und der Muskelfaserquerschnittsfläche im M. soleus männlicher ICS-Tiere die Vermutung nahe, dass der Einfluss von ICS über proinflammatorische und Atrophie-bezogene Prozesse in dem Skelettmuskel, der vor allem aus Typ I-Fasern besteht, verzögert abläuft.

Auch in der Skelettmuskulatur weiblicher ICS-Tiere zeigen die Ergebnisse keinen klaren Hinweis auf einen solchen Zusammenhang.

Deshalb sollte in künftigen Untersuchungen der Zusammenhang von proinflammatorischen bzw. Atrophie-relevanten Markern und der Muskelfaserquerschnittsfläche bzw. der Faserdichte ebenfalls in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten betrachtet werden.

Im Tiermodell sollten zur weiteren Untersuchung dieses Zusammenhangs Skelettmuskeln mit vorwiegend Typ II-Fasern von männlichen Tieren eingesetzt werden.

#### **4.8 Mitochondrien**

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden auf subzellulärer Ebene die Mitochondrien hinsichtlich ihrer Anzahl, Fläche und Morphologie untersucht. Zudem wurde die relative Expression des Sod2-Gens im M. gastrocnemius und M. soleus bestimmt.

Die Mitochondriendichte im M. gastrocnemius bzw. M. soleus männlicher ICS-Tiere war gegenüber der Kontrolle um 17,6 % bzw. 7,9 % geringer. Bei weiblichen ICS-Tieren war die Mitochondriendichte im M. gastrocnemius im Vergleich zur Kontrolle hingegen um 27,9 % höher und im M. soleus im Vergleich zur Kontrolle ähnlich. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die morphologische Qualität der Mitochondrien im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher und weiblicher Tiere negativ durch ICS beeinflusst wurde. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg „defekter“ Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienzahl sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus männlicher ICS-Tiere um 30,7 % bzw. 16,9 %. Auch bei weiblichen ICS-Tieren konnte ein signifikanter Anstieg „defekter“ Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienzahl im M. gastrocnemius um 22,5 % und im M. soleus um 31,1 % nachgewiesen werden. Es fanden sich ein Verlust Intaktheit der Cristae und Zeichen der Autophagie. Zusätzlich konnte im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher ICS-Tiere eine deutliche Größenzunahme der Mitochondrien beobachtet werden. So nahm die Mitochondriengröße männlicher ICS-Tiere im M. gastrocnemius um 63,5 % und im M. soleus um 26,8 % zu, während diese in weiblichen ICS-Tieren sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus ähnlich zur Mitochondriengröße der Kontrolle war.



Die relative Expression des Sod2-Gens war im M. gastrocnemius sowohl männlicher wie auch weiblicher ICS-Tiere gegenüber Kontrollen reduziert. Im M. soleus männlicher ICS-Tiere war die Genexpression von Sod2 ebenfalls vermindert.

Diese Ergebnisse ergänzen Daten von FMS-Patienten, die im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls eine Veränderung der Mitochondrien hinsichtlich Anzahl, Größe, Form, Funktion und Organisation zeigen: So wurde berichtet, dass die Cristae der Mitochondrien in der Skelettmuskulatur einiger FMS-Patienten leicht unregelmäßig waren (Drewes et al., 1993) und die Verteilung der Mitochondrien ungewöhnlich war (Srikuea et al., 2013). Ferner wurde eine signifikant verringerte Anzahl an Mitochondrien, die zusätzlich eine veränderte Form besaßen, in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten gefunden: Die Mitochondrien waren signifikant größer als die der Kontrolle (Sprott et al., 2004). Eine weitere Studie konnte bestätigen, dass die Mitochondrien in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten eine veränderte Form besitzen (Gadallah et al., 2013).

Die nachgewiesene verminderte relative Expression des Sod2-Gens in der Skelettmuskulatur von ICS-Tieren erweitert die Daten anderer Studien, die das Vorhandensein von oxidativem Stress in FMS-Patienten untersuchten:

Es konnte ein signifikant vermindertes Serumlevel an Superoxiddismutase, einem intrazellulärem Antioxidans, gefunden werden (Bagis et al., 2005). Weiterhin zeigten sich vermehrt mitochondriale ROS in PBMCs von FMS-Patienten (Cordero et al., 2013; Cordero et al., 2009). Außerdem wurden in PBMCs von FMS-Patienten ein signifikant vermindertes Level an Coenzym Q10, das in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, und ein erhöhtes Level an Lipidperoxidation gefunden (Castro-Marrero et al., 2013; Cordero et al., 2012; Cordero et al., 2010). Es wird vermutet, dass oxidativer Stress und bioenergetische Dysfunktion von Mitochondrien verbreitet in FMS-Patienten vorkommen und mit der Schwere der Symptome zusammenhängen (Castro-Marrero et al., 2013; Cordero et al., 2013; Cordero et al., 2011).

Ein gegensätzliches Ergebnis liefert jedoch eine Studie, welche die F2-Isoprostan-Exkretion über den Urin als Marker für oxidativen Stress von FMS-Patienten untersucht hat: Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden (Chung et al., 2009).

Neben den morphologischen (qualitativen/quantitativen) Aspekten der Mitochondrien ist auch der Metabolismus der Muskulatur von FMS-Patienten Gegenstand vieler Untersuchungen. Zum einen wurde der Phosphatstoffwechsel in verschiedenen Muskeln analysiert. Hierbei wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Während einige Studien eine Abnahme von phosphathaltigen Energieträgern wie ATP oder Kreatinphosphat in der Muskulatur von FMS-Patienten zeigten (Bengtsson et al., 1986b; Gerdle et al., 2013; Park et al., 1998; Sprott et al., 2000), wurden in anderen Veröffentlichungen diese Ergebnisse nicht bestätigt (Blécourt et al., 1991; Jubrias et al., 1994; Simms et al., 1994). Es wurde vermutet, dass die Abnahme von ATP und Kreatinphosphat in der Muskulatur von FMS-Patienten eine Folge der Kombination aus körperlicher Inaktivität auf Grund von Schmerzen und einer Dysfunktion muskulärer Mitochondrien ist (Gerdle et al., 2013).

Außerdem wurde in PBMCs eine mitochondriale Dysfunktion anhand eines signifikant reduzierten mitochondrialen Membranpotentials (Cordero et al., 2010) und einer verminderten Citrat-Synthase-Aktivität nachgewiesen (Cordero et al., 2010; Castro-Marrero et al., 2013). Auch der Gehalt an mtDNA in PBMCs von FMS-Patienten war gegenüber gesunden Kontrollen verringert (Castro-Marrero et al., 2013; Cordero et al., 2013).

Weiterhin wurden bei FMS-Patienten im Vergleich zur Kontrolle Unterschiede im Lactat-Pyruvat-Metabolismus gefunden: so war bei FMS-Patienten die interstitielle Konzentration von Pyruvat und Lactat im M. trapezius in Ruhe signifikant erhöht, was Zeichen einer mitochondrialen Insuffizienz sein könnte (Gerdle et al., 2010). Untersuchungen des M. vastus lateralis bzw. des M. trapezius zeigten hierzu allerdings kontroverse Ergebnisse: Hier wurde kein Unterschied der Lactat-Konzentration des Muskels in Ruhe festgestellt. Auch waren die Pyruvat-Konzentrationen nicht signifikant verändert (Bengtsson et al., 1986b; McIver et al., 2006). Durch eine andere Arbeitsgruppe konnte im ICS-Mausmodell nachgewiesen werden, dass die LDH-Aktivität in mitochondrialen Extrakten peripherer Skelettmuskulatur männlicher wie auch weiblicher ICS-Tiere im Vergleich zu Kontrollen erhöht war. In Zusammenschau mit nachgewiesenermaßen geschädigten Mitochondrien wurde die erhöhte LDH-Aktivität im Rahmen einer nicht mehr funktionierenden oxidativen Verwertung des

Pyruvats gesehen, welches folglich durch die LDH in Lactat umgewandelt wird (Oezel et al., 2016).

In Zusammenschau der hier vorgestellten Ergebnisse mit oben genannter Literatur ergeben sich klare Hinweise darauf, dass sowohl in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten wie auch von ICS-Mäusen morphologische wie auch funktionelle Veränderungen bzw. Schädigungen der Mitochondrien, möglicherweise mitverursacht durch ROS, vorhanden sind.

Die Daten bzgl. morphologischer (qualitativer und quantitativer) Veränderungen der Mitochondrien in ICS-Tieren, die möglicherweise auch Einfluss auf deren Funktion haben, könnten nicht nur die oxidative Kapazität der Muskulatur beeinträchtigen, sondern auch zur Atrophie einzelner Muskelfasern führen. Die reduzierte Expression des Sod2-Gens könnte auf eine verminderte antioxidative Funktion der mitochondrial lokalisierten Superoxiddismutase2 hindeuten, was ebenfalls zur Schädigung der Mitochondrien und der dort lokalisierten Enzyme durch ROS beitragen könnte. Zwar konnten die Veränderungen der Mitochondrienmorphologie in beiden untersuchten Skelettmuskeln beider Geschlechter gefunden werden, jedoch war vor allem die Anzahl der Mitochondrien im M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere im Vergleich zur Kontrolle vermindert und die Mitochondrienquerschnittsfläche erhöht. Deshalb sollte in künftigen Untersuchungen zu Mitochondrien im FMS bevorzugt der M. gastrocnemius männlicher ICS-Tiere analysiert werden. In künftigen tierexperimentellen Untersuchungen zum FMS mittels ICS-Modell sollten ferner zur weiteren Evaluation mitochondrialer Funktionsstörungen neben den bereits durchgeführten morphologischen (qualitativen/quantitativen) Untersuchungen der Mitochondrien auch der Metabolismus der Muskulatur, im Speziellen die phosphathaltigen Energieträger ATP und Kreatinphosphat wie auch der Lactat- und Pyruvatgehalt der Skelettmuskulatur untersucht und quantifiziert werden. Darüberhinaus sollten weitere oxidative und antioxidative Parameter und auch die Sod2-Expression auf Proteinebene in der Skelettmuskulatur von ICS-Tieren bestimmt werden, um die Pathophysiologie des FMS weiter zu erforschen.

## 5 Zusammenfassung

Das Fibromyalgie-Syndrom (FMS) gehört zu den chronischen Schmerzsyndromen, dessen Ätiologie bisher nicht geklärt werden konnte. Es zeichnet sich vor allem durch Muskelschmerzen in verschiedenen Körperregionen aus. Daneben liegen häufig weitere Symptome wie Rückenschmerzen, Müdigkeit, Schlafstörungen, Parästhesien, Morgensteifigkeit oder Depressionen vor. In Deutschland kann das FMS nach den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) aus dem Jahre 1990, nach den modifizierten vorläufigen ACR-Kriterien aus dem Jahre 2010 oder nach den symptom-basierten Kriterien der S3-Leitlinie zum FMS (AWMF-Kriterien) diagnostiziert werden. In den USA leiden circa 2 % der Gesamtbevölkerung an FMS, wobei das weibliche Geschlecht (3,4 % der Frauen) deutlich häufiger als das männliche (0,5 % der Männer) betroffen ist. Es gibt verschiedenartige Ansätze zur Klärung der Ätiopathogenese des FMS. So werden strukturelle, morphologische wie auch metabolische Veränderungen der Skelettmuskulatur diskutiert, die zur Symptomatik des FMS führen könnten. Daneben existieren Hypothesen, nach denen ein Ungleichgewicht an pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, oxidativer Stress, mitochondriale Dysfunktion oder eine abnorme zentrale Schmerzverarbeitung Ursache des FMS sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des intermittierenden Kältestressmodells (ICS-Modell) geprüft, wie sich ICS auf die Skelettmuskulatur (M. gastrocnemius und M. soleus) männlicher und weiblicher Mäuse auswirkt. Dazu wurden mittels (immun)histochemischer Färbungen, molekularbiologischer Untersuchungen und Elektronenmikroskopie die Morphologie, Kapillarisation und Angiogenese, der Glykogengehalt, inflammatorische, Atrophie- und Apoptose-relevante Parameter, Innervation und intramuskuläre Mitochondrien der Skelettmuskulatur von ICS- und Kontrolltieren analysiert. Eine Limitierung der gefundenen Ergebnisse stellt die Tatsache dar, dass bei den Tieren keine Untersuchung der Nozizeption durchgeführt wurde und so ICS-induzierte Unterschiede in der Schmerzschwelle zwischen ICS- und Kontrolltieren nicht evaluierbar sind.

Durch ICS war die mittlere Muskelfaserquerschnittsfläche männlicher Tiere im M. gastrocnemius um 21,6 % und im M. soleus um 33,2 % kleiner als im Vergleich zur

Kontrollgruppe. Die mittlere Faserdichte männlicher ICS-Tiere war hingegen im M. gastrocnemius um 22,9 % und im M. soleus um 9,4 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Weiterhin war die Anzahl der Kapillarkontakte pro Muskelfaser sowohl im M. gastrocnemius wie auch im M. soleus männlicher ICS-Tiere signifikant um 12,5 % bzw. 11,8 % erniedrigt. Zudem war bei männlichen ICS-Tieren die relative Expression Angiogenese-relevanter (Vegfa, Vegfb, Notch1, Notch3) Gene in beiden Skelettmuskeln vermindert. ICS hat in männlichen Tieren ferner zu einer Dichtezunahme Atrophie-relevanter Zellen (MuRF1<sup>+</sup> bzw. Fbxo32<sup>+</sup>) sowohl im M. gastrocnemius als auch im M. soleus geführt. So stieg die Dichte MuRF1<sup>+</sup>-Zellen in männlichen ICS-Tieren im M. gastrocnemius um 14,7 % und im M. soleus um 29,7 % im Vergleich zur Kontrolle an. Die Dichte Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen in männlichen ICS-Tieren war im M. gastrocnemius signifikant um 17,7 % und im M. soleus um 8,9 % im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. In weiblichen ICS-Tieren war die relative Expression des MuRF1- bzw. Fbxo32-Gens in beiden Skelettmuskeln gegenüber der Kontrolle erhöht, die Dichte an MuRF1<sup>+</sup>- und Fbxo32<sup>+</sup>-Zellen jedoch nicht. Es fanden sich Hinweise darauf, dass im M. gastrocnemius, der vor allem aus Typ II-Muskelfasern besteht, männlicher ICS-Tiere inflammatorische und/oder Atrophie-relevante Proteine mit der Regulation der Faserdichte und/oder der Muskelfaserquerschnittsfläche verknüpft sind. Apoptotische oder die Innervation betreffende Veränderungen der Skelettmuskulatur scheinen hingegen nicht durch ICS beeinflusst zu werden. Weiterhin war durch ICS die Mitochondriendichte im M. gastrocnemius und M. soleus männlicher Tiere um 17,6 % bzw. 7,9 % im Vergleich zu den Kontrollen verringert. Die Mitochondrienmorphologie wurde durch ICS sowohl in männlichen wie auch in weiblichen Tieren negativ beeinflusst. In männlichen ICS-Tieren nahm der Anteil „defekter“ Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienanzahl im M. gastrocnemius um 30,7 % bzw. im M. soleus um 16,9 % zu. In weiblichen ICS-Tieren nahm der Anteil „defekter“ Mitochondrien an der Gesamtmitochondrienanzahl im M. gastrocnemius bzw. im M. soleus um 22,5 % bzw. 31,1 % zu. In männlichen ICS-Tieren nahm die Mitochondriengröße im M. gastrocnemius um 63,5 % und im M. soleus um 26,8 % zu.

Diese Ergebnisse bestätigen bereits beschriebene Veränderungen in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten und deuten darauf hin, dass durch ICS vor allem im M. gastrocnemius männlicher Tiere atrophische Prozesse einsetzen, die zu einer

verminderten Muskelfaserquerschnittsfläche führen. An diesem Vorgang scheinen die beiden E3-Ubiquitin-Ligasen MuRF1 und Fbxo32 beteiligt zu sein. Diese Prozesse scheinen in der Skelettmuskulatur weiblicher Tiere erst später einzusetzen. Die Verringerung der Kapillarisation der Skelettmuskulatur männlicher ICS-Tiere weist darauf hin, dass ICS die Verteilung von Sauerstoff und Nährstoffen hin zu den Muskelfasern und den Abtransport von Stoffwechselprodukten reduziert. Dies könnte das Auftreten von Schmerzen und Fatigue nach Belastung bei FMS-Patienten erklären. Weiterhin wurden auch die Mitochondrien besonders im M. gastrocnemius männlicher Tiere in Hinblick auf Anzahl, Größe und Morphologie durch ICS beeinflusst. Wir gehen davon aus, dass die zahlenmäßigen und morphologischen Veränderungen der Mitochondrien zu einem Funktionsverlust der Mitochondrien führen könnten. Dieser könnte seinerseits zu einer Verminderung der oxidativen Kapazität der Skelettmuskulatur und zur Atrophie von Muskelfasern führen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass in künftigen Untersuchungen zum FMS mittels ICS-Mausmodell vor allem der M. gastrocnemius männlicher Tiere analysiert werden sollte, da hier die ICS-induzierten Veränderungen früher und deutlicher als bei weiblichen Tieren eingesetzt haben. Zur weiteren Evaluation mitochondrialer Funktionsstörungen sollte der Metabolismus, im Speziellen die phosphathaltigen Energieträger ATP und Kreatinphosphat wie auch der Lactat- und Pyruvatgehalt, in der Skelettmuskulatur von ICS-Tieren untersucht und quantifiziert werden. Darüberhinaus sollten oxidative und antioxidative Parameter in der Skelettmuskulatur von ICS-Tieren bestimmt werden, um die Pathophysiologie des FMS weiter zu erforschen. Ebenso sollte die Proteinexpression von IL-6 und TNF sowie die Invasion von CD68<sup>+</sup>-Zellen in der Skelettmuskulatur von männlichen ICS-Tieren genauer untersucht werden.

Auch sollte der Zusammenhang von proinflammatorischen bzw. Atrophie-relevanten Markern und der Muskelfaserquerschnittsfläche bzw. der Faserdichte ebenfalls in der Skelettmuskulatur von FMS-Patienten untersucht werden. Bei entsprechender klinischer Datenlage könnten die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse deshalb zu neuen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten führen.

## 6 Summary

Fibromyalgia syndrome (FMS) is a chronic pain disorder with unknown etiology. It is characterized by widespread musculoskeletal pain in different regions of the body. Furthermore, it is often accompanied by back pain, fatigue, sleep disturbances, paresthesias, morning stiffness or depressions. In Germany FMS is allowed to be diagnosed either according to the criteria for classification of fibromyalgia established by the American College of Rheumatology (ACR) in 1990 or according to the preliminary diagnostic criteria by the ACR in 2010 or according to the symptom-based S3-guideline by the Association of the Medical Scientific Societies in Germany (AWMF). The prevalence of FMS in the USA is 2 % for both sexes with dominance of the female sex (3,4 % for women and 0,5 % for men). There are various different approaches to the etiopathogenesis of FMS. On the one hand, structural, morphological as well as metabolic changes in the skeletal muscles could induce the symptoms of FMS. On the other hand, an imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, oxidative stress, mitochondrial dysfunction or an altered central pain processing could be the causes of FMS.

In the present study we used the mouse model of FMS using intermittent cold stress (ICS). The aim of this study was to investigate how ICS affects skeletal muscles (M. gastrocnemius and M. soleus) of male and female mice. For this purpose we made use of (immun)histochemical stainings, molecular biological techniques and transmission electron microscopy for revealing changes in the morphology, capillarization and angiogenesis, content of glycogen, inflammation, atrophy, apoptosis, innervation and mitochondria of skeletal muscles. However, the results are limited through a lack of nociception tests after ICS-treatment and in control mice. So we can't evaluate ICS-induced changes in the pain threshold between ICS and control mice.

There was a 21,6 % and 33,2 % decrease in fiber cross sectional area (FCSA) in gastrocnemius/soleus and a 22,9 % and 9,4 % increase in fiber density in the male ICS mice in gastrocnemius/soleus. These changes are found especially in gastrocnemius of male ICS mice. In addition, a 12,5 % and 11,8 % decrease of the capillary contacts per fiber exists in gastrocnemius and soleus muscles of male ICS mice in comparison with

the control. Furthermore, Vegfa, Vegfb, Notch1 and Notch3 expressions (RNA level) were decreased in gastrocnemius and soleus muscles of male ICS mice.

Gastrocnemius and soleus muscles of male ICS mice show an 14,7 % and 29,7 % increase of density of MuRF1<sup>+</sup> cells and an 17,7 % and 8,9 % increase of density of Fbxo32<sup>+</sup> cells, whereas in female ICS mice MuRF1 expression and Fbxo32 expression (RNA level) were increased in these muscles. In contrast, the densities of MuRF1<sup>+</sup> and Fbxo32<sup>+</sup> cells were not increased in female ICS mice.

There is evidence, that in gastrocnemius (only consisting of type IIa fibers) of male ICS mice inflammation and/or atrophy-relevant proteins seem to be associated with the regulation of fiber density and/or FCSA.

In contrast, apoptosis and innervation seem not to be influenced by ICS.

Furthermore, there was a 17,6 % and 7,9 % decrease of density of mitochondria in gastrocnemius and soleus of male ICS mice in comparison with control. Additionally, ICS affected the morphology of mitochondria negatively in gastrocnemius and soleus muscles of male, but also in female mice. In gastrocnemius muscles there was a significant 30,7 % increase of “damaged” mitochondria in male ICS mice and a significant 22,5 % increase in female ICS mice in comparison with the control. Moreover, in soleus muscles there was a significant 16,9 % increase of “damaged” mitochondria in male ICS mice and a significant 31,1 % increase in female ICS mice in comparison with the control.

In male ICS mice the size of mitochondria showed an 63,5 % and 26,8 % increase in gastrocnemius and soleus muscles in comparison with the control.

These results confirm already described findings in skeletal muscles of FMS patients. They suggest that ICS induces atrophic processes especially in gastrocnemius of male ICS mice, which leads to a decreased FCSA. The two muscle-specific E3 ubiquitin ligases MuRF1 and Fbxo32 seem to be involved in these processes. In skeletal muscles of female mice ICS-induced alterations seem to occur not at all or delayed. The decrease in capillarization of skeletal muscles in male ICS mice points to a reduced distribution of oxygen and nutritive substances to muscle fibers and to a decreased evacuation of end products of the metabolism. These changes could explain the pain and the postexertional fatigue in FMS patients. In addition to the described results,



mitochondrial alterations seem to be induced by ICS especially in gastrocnemius muscle of male mice. The present results suggest that the numerical and morphological mitochondrial abnormalities lead to an impaired mitochondrial function. This could not only lead to a loss of oxidative capacity but also to an atrophy of muscle fibers.

We recommend for future research on FMS using ICS to prefer gastrocnemius muscle of male ICS mice because the ICS-induced alterations in male mice begin earlier and more clearly than in female mice. Moreover, in further research there should be an observance of the metabolism of the skeletal muscles for clearing mitochondrial disorders. Especially the concentrations of adenosine triphosphate (ATP) and phosphocreatinine as well as the concentrations of lactate and pyruvate should be investigated and quantified in skeletal muscles of ICS mice. Furthermore, there should be research on oxidative and anti-oxidative parameters in the skeletal muscles of ICS mice for further research on the pathophysiology of FMS. Additionally, the protein expression of IL-6 and TNF as well as a potential invasion of CD68<sup>+</sup> cells in skeletal muscle of male ICS mice should be taken into consideration.

Moreover, the correlation between inflammation and/or atrophy-relevant proteins and fiber density and/or FCSA should be tested in skeletal muscles of FMS patients. Presuming appropriate clinical data, the results of this dissertation might open novel possibilities for therapeutic intervention.

# Anhangsverzeichnis

## Anhang A: Diagnosekriterien des Fibromyalgie-Syndroms

|  |       |
|--|-------|
| Anhang A-1: Kriterien zur Klassifikation der Fibromyalgie vom American College of Rheumatology aus dem Jahre 1990 *    | XVIII |
| Anhang A-2: Die vorläufigen Diagnosekriterien der Fibromyalgie vom American College of Rheumatology aus dem Jahre 2010 | XIX   |
| Anhang A-3: AWMF-Kriterien für die klinische Diagnose des FMS  | XX    |

## Anhang B: M. gastrocnemius

|   |        |
|---|--------|
| Anhang B-1: Kapillarisation im M. gastrocnemius.  | XXI    |
| Anhang B-2: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach ATPase-Färbung.  | XXII   |
| Anhang B-3: Anteil der verschieden gefärbten (ungefärbt bzw. hell/mittel/dunkel) Fasern an der Gesamtfaserzahl (in %) nach PAS-Färbung im M. gastrocnemius. | XXIII  |
| Anhang B-4: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach PAS-Färbung  | XXIII  |
| Anhang B-5: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-IL-1 $\beta$ -Antikörpern   | XXIV   |
| Anhang B-6: IL-1 $\beta$ im M. gastrocnemius  | XXV    |
| Anhang B- 7: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-COX-2-Antikörpern  | XXVI   |
| Anhang B-8: COX-2 im M. gastrocnemius.  | XXVII  |
| Anhang B-9: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-MIF-Antikörpern   | XXVIII |
| Anhang B-10: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-CD68-Primärantikörpern   | XXIX   |
| Anhang B-11: CD68 im M. gastrocnemius.  | XXIX   |
| Anhang B-12: Relative Expression (qRT-PCR) von Apoptose-relevanten Genen im M. gastrocnemius  | XXX    |
| Anhang B-13: Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung zur Darstellung motorischer Endplatten                     | XXXI   |
| Anhang B-14: Motorische Endplatten (n/Muskelfaser) im M. gastrocnemius.   | XXXI   |

## Anhang C: M. soleus

|   |        |
|---|--------|
| Anhang C-1: Kapillarisation im M. soleus  | XXXII  |
| Anhang C-2: Anteil der verschiedenen Muskelfasertypen an der Gesamtfaseranzahl (in %) im M. soleus nach ATPase-Färbung. | XXXIII |

|   |         |
|---|---------|
| Anhang C 3: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach ATPase-Färbung. ....  | XXXIII  |
| Anhang C-4: Anteil der verschieden gefärbten (ungefärbt bzw. hell/mittel/dunkel) Fasern an der Gesamtfaserzahl (in %) nach PAS-Färbung im M. soleus. .... | XXXIV   |
| Anhang C-5: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach PAS-Färbung. ....   | XXXIV   |
| Anhang C-6: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-IL-1 $\beta$ -Antikörpern . ....   | XXXV    |
| Anhang C-7: Dichte IL-1 $\beta^+$ -Zellen (n/mm <sup>2</sup> ) im M. soleus. ....   | XXXVI   |
| Anhang C-8: Anteil COX-2 <sup>+</sup> -Kapillaren an der Gesamtkapillaranzahl (in %) im M. soleus. ...  | XXXVII  |
| Anhang C-9: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-COX-2-Antikörpern . ....   | XXXVIII |
| Anhang C-10: Beispielaufnahmen mit dem FluoView FV1000 Konfokalmikroskop im M. soleus. ....   | XXXIX   |
| Anhang C-11: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-MIF-Antikörpern . ....  | XL      |
| Anhang C-12: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-CD68-Primärantikörpern.....   | XLI     |
| Anhang C-13: CD68 im M. soleus. ....  | XLI     |
| Anhang C-14: Relative Expression (qRT-PCR) des TNF-Gens im M. soleus .....  | XLII    |
| Anhang C-15: Relative Expression (qRT-PCR) von Apoptose-relevanten Genen im M. soleus   | XLIII   |
| Anhang C-16: Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung zur Darstellung motorischer Endplatten .....                    | XLIV    |
| Anhang C-17: Motorische Endplatten (n/Muskelfaser) im M soleus.....   | XLIV    |

# Anhang

## Anhang A: Diagnosekriterien des Fibromyalgie-Syndroms

### 1. History of widespread pain.

*Definition.* Pain is widespread when all of the following are present: pain in the left side of the body, pain in the right side of the body, pain above the waist, and pain below the waist. In addition, axial skeletal pain (cervical spine or anterior chest or thoracic spine or low back) must be present. In this definition, shoulder and buttock pain is considered as pain for each involved side. "Low back" pain is considered lower segment pain.

### 2. Pain in 11 of 18 tender point sites on digital palpation.

*Definition.* Pain, on digital palpation, must be present in at least 11 of the following 18 tender point sites:

*Occiput:* bilateral, at the suboccipital muscle insertions.

*Low cervical:* bilateral, at the anterior aspects of the intertransverse spaces at C5-C7.

*Trapezius:* bilateral, at the midpoint of the upper border.

*Supraspinatus:* bilateral, at origins, above the scapula spine near the medial border.

*Second rib:* bilateral, at the second costochondral junctions, just lateral to the junctions on upper surfaces.

*Lateral epicondyle:* bilateral, 2 cm distal to the epicondyles.

*Gluteal:* bilateral, in upper outer quadrants of the buttocks in anterior fold of muscle.

*Greater trochanter:* bilateral, posterior to the trochanteric prominence.

*Knee:* bilateral, at the medial fat pad proximal to the joint line.

Digital palpation should be performed with an approximate force of 4kg.

For a tender point to be considered "positive" the subject must state that the palpation was painful. "Tender" is not to be considered "painful".

\* For classification purpose, patients will be said to have fibromyalgia if both criteria are satisfied. Widespread pain must have been present for at least 3 months. The presence of a second clinical disorder does not exclude the diagnosis of fibromyalgia.

**Anhang A-1:** Kriterien zur Klassifikation der Fibromyalgie vom American College of Rheumatology aus dem Jahre 1990 \* (aus: Wolfe et al., 1990).

**Criteria**

A patient satisfies diagnostic criteria for fibromyalgia if the following 3 conditions are met:

- 1) Widespread pain index (WPI)  $\geq 7$  and symptom severity (SS) scale score  $\geq 5$  or WPI 3-6 and SS scale score  $\geq 9$ .
- 2) Symptoms have been present at a similar level for at least 3 months.
- 3) The patient does not have a disorder that would otherwise explain the pain.

**Ascertainment**

- 1) WPI: note the number areas in which the patient has had pain over the last week. In how many areas has the patient had pain? Score will be between 0 and 19.

|                        |                                  |           |            |
|------------------------|----------------------------------|-----------|------------|
| Shoulder girdle, left  | Hip (buttock, trochanter), left  | Jaw, left | Upper back |
| Shoulder girdle, right | Hip (buttock, trochanter), right | Jaw right | Lower back |
| Upper arm, left        | Upper leg, left                  | Chest     | Neck       |
| Upper arm, right       | Upper leg, right                 | Abdomen   |            |
| Lower arm, left        | Lower leg, left                  |           |            |
| Lower arm, right       | Lower leg, right                 |           |            |

- 2) SS scale score:

Fatigue

Waking unfreshed

Cognitive symptoms

For the each of the 3 symptoms above, indicate the level of severity over the past week using the following scale:

0 = no problem

1 = slight or mild problems, generally mild or intermittent

2 = moderate, considerable problems, often present and/or at a moderate level

3 = severe: pervasive, continuous, life-disturbing problems

Considering somatic symptoms in general, indicate whether the patient has: \*

0 = no symptoms

1 = few symptoms

2 = a moderate number of symptoms

3 = a great deal of symptoms

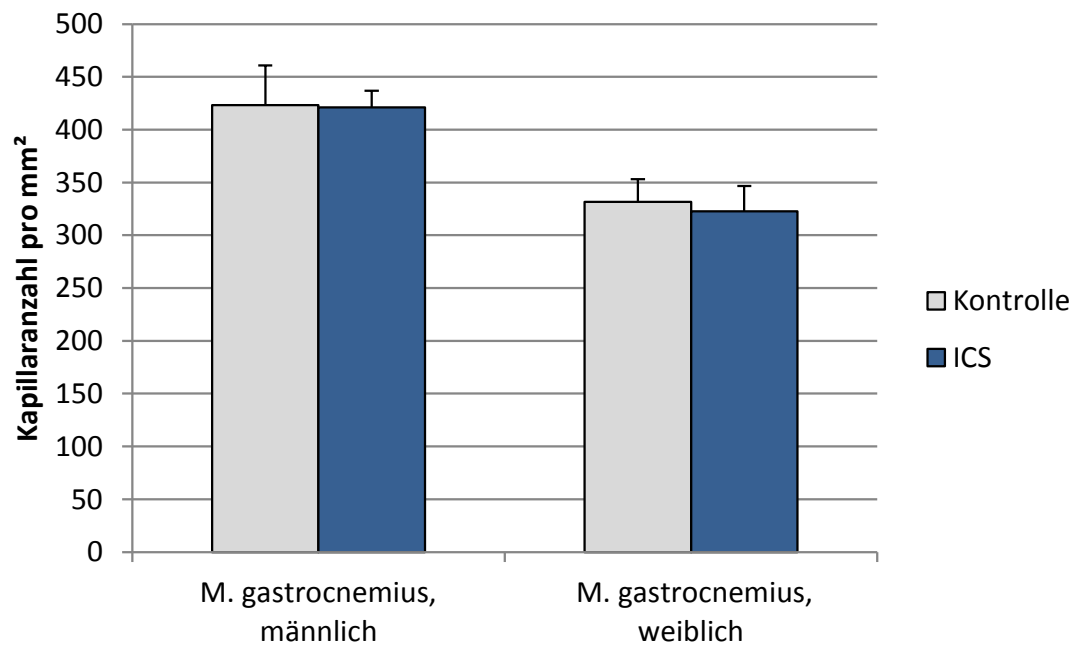
The SS scale score is the sum of the severity of the 3 symptoms (fatigue, waking unfreshed, cognitive symptoms) plus the extent (severity) of somatic symptoms in general. The final score is between 0 and 12.

\* Somatic symptoms that might be considered: muscle pain, irritable bowel syndrome, fatigue/tiredness, thinking or remembering problem, muscle weakness, headache, pain/cramps in the abdomen, numbness/tingling, dizziness, insomnia, depression, constipation, pain in the upper abdomen, nausea, nervousness, chest pain, blurred vision, fever, diarrhea, dry mouth, itching, wheezing, Raynaud's phenomenon, hives/welts, ringing in ears, vomiting, heartburn, oral ulcers, loss of/change in taste, seizures, dry eyes, shortness of breath, loss of appetite, rash, sun sensitivity, hearing difficulties, easy bruising, hair loss, frequent urination, painful urination, and bladder spasms.

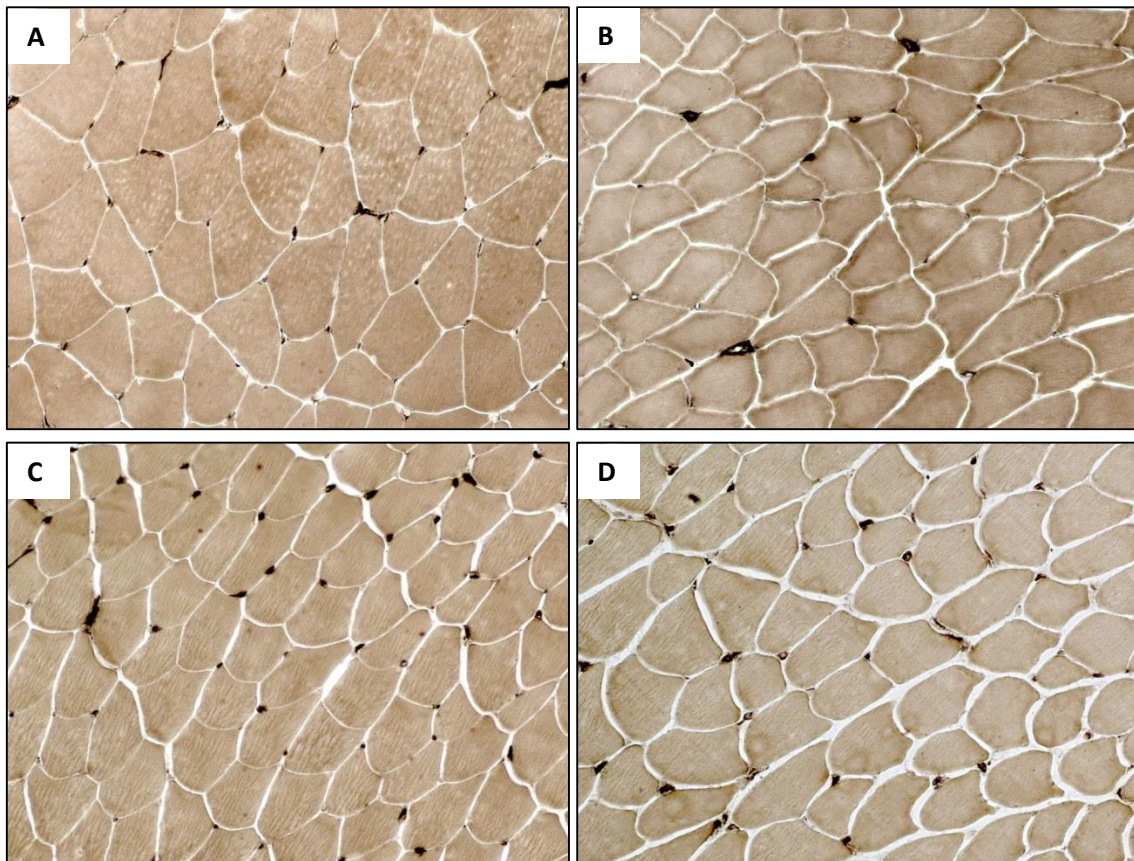
**AWMF-Kriterien für die klinische Diagnose des FMS**

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <i>Obligates Hauptsymptom</i>    | Chronic widespread pain nach ACR 1990-Kriterien  |
| <i>Obligate weitere Symptome</i> | Müdigkeit (körperlich und/oder geistig) und Schlafstörungen und/oder nicht erholsamer Schlaf und Schwellungs- und/oder Steifigkeitsgefühl Hände und/oder Füße und/oder Gesicht |
| <i>Ausschlussdiagnostik</i>      | Ausschluss einer körperlichen Erkrankung, welche das typische Symptommuster ausreichend erklärt  |

**Anhang A-3:** AWMF-Kriterien für die klinische Diagnose des FMS (aus: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2012).

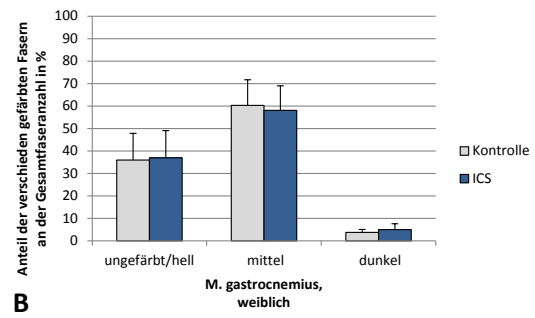
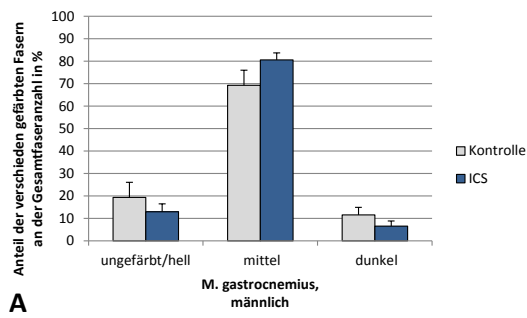
**Anhang B: M. gastrocnemius**

**Anhang B-1:** Kapillarisation im M. gastrocnemius. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016).

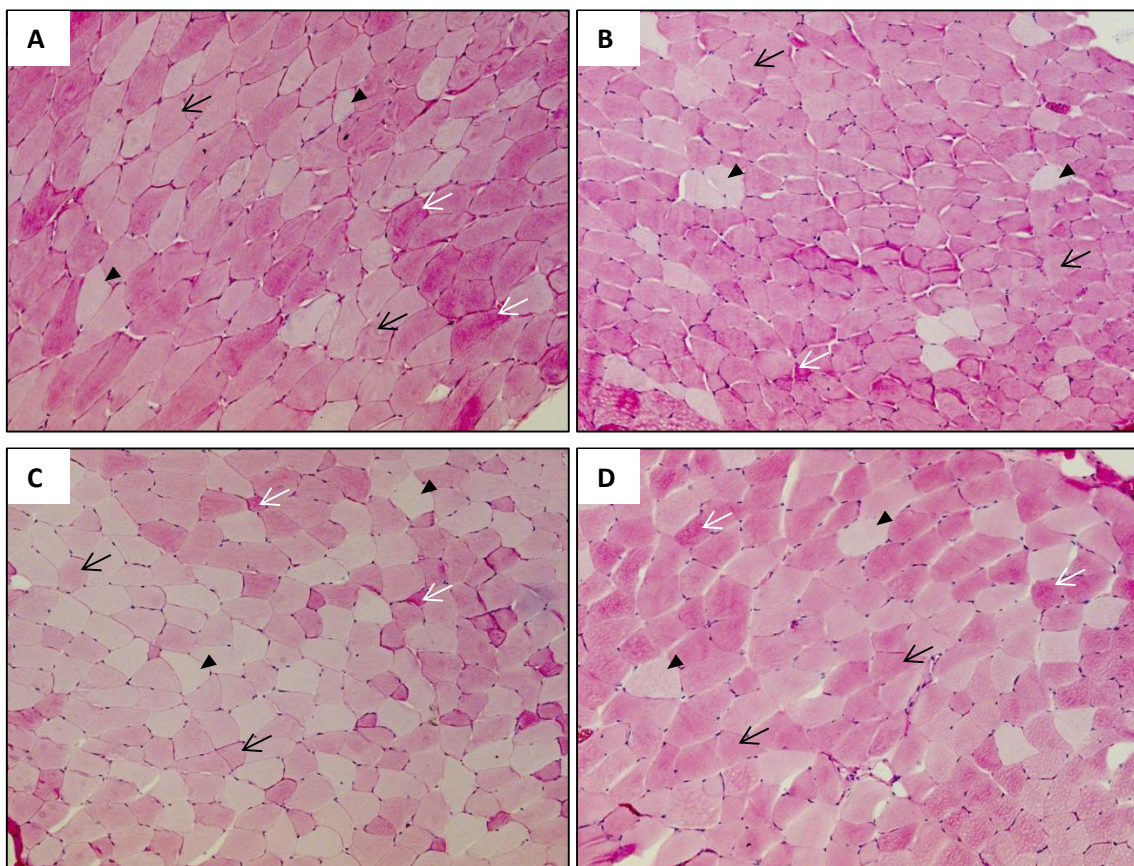


**Anhang B-2:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach ATPase-Färbung. (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D) Weibliche ICS-Maus. Originalvergrößerung: x200 (Bonaterra et al., 2016).

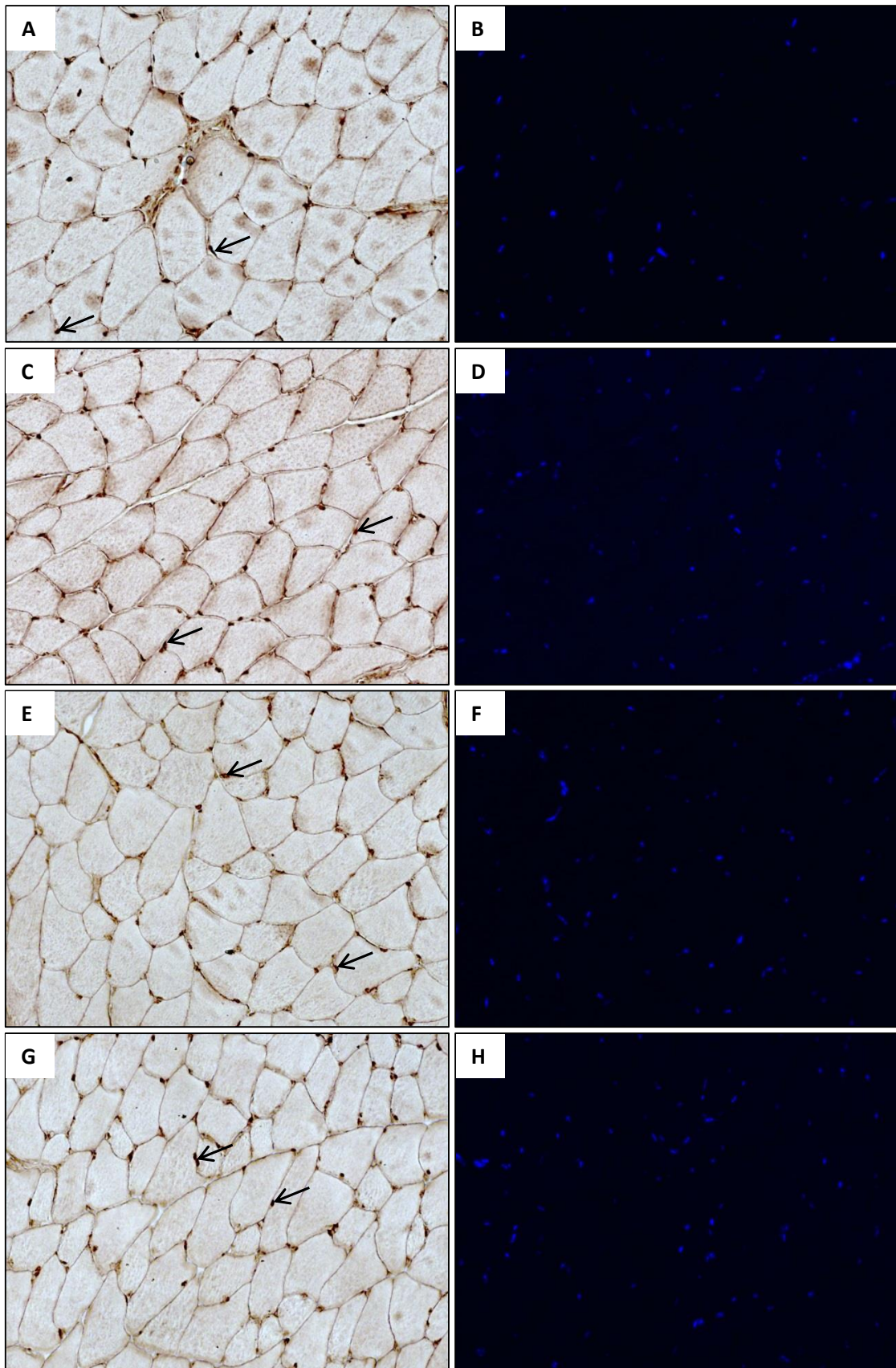




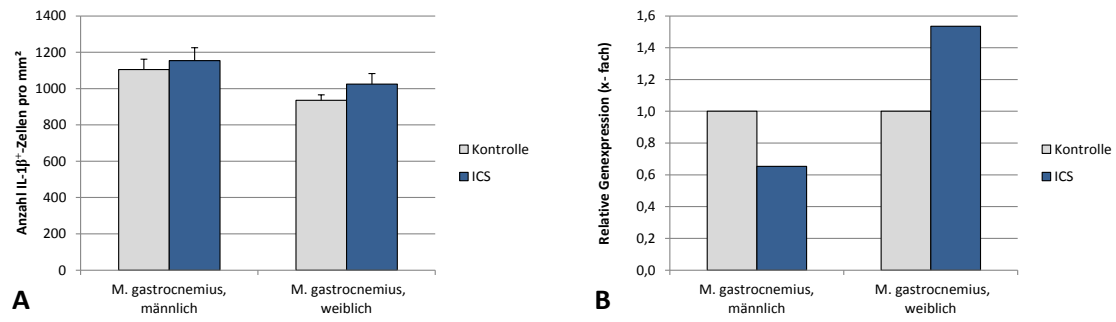
**Anhang B-3:** Anteil der verschieden gefärbten (ungefärbt bzw. hell/mittel/dunkel) Fasern an der Gesamtfaserzahl (in %) nach PAS-Färbung im M. gastrocnemius. (A). Männliche Tiere. (B): Weibliche Tiere. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9.



**Anhang B-4:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach PAS-Färbung. (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D) Weibliche ICS-Maus. Dunkle Fasern (weiße Pfeile), mittlere Fasern (schwarze Pfeile), ungefärbte/helle Fasern (schwarze Pfeilspitzen). Originalvergrößerung: x100.

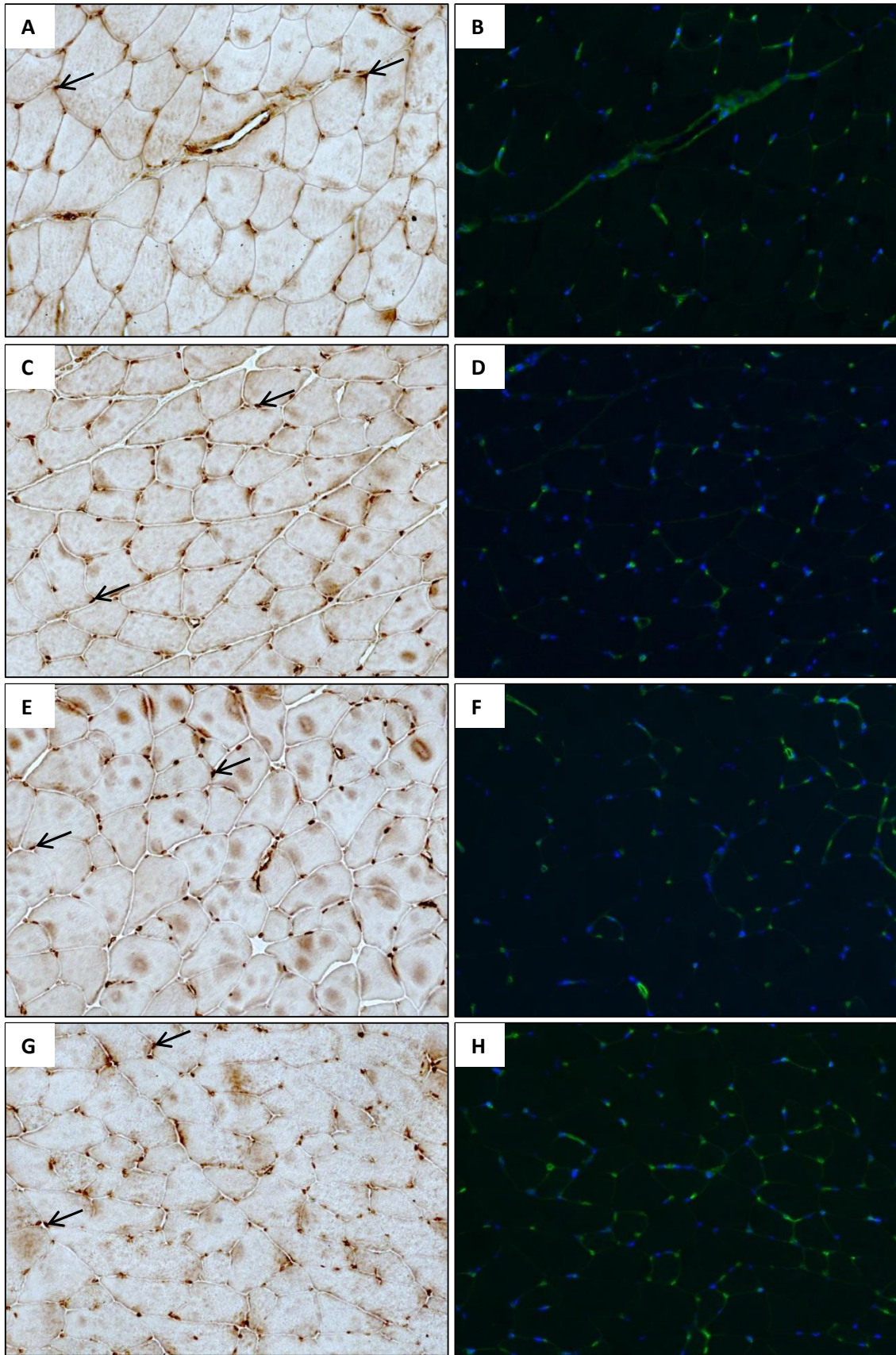


**Anhang B-5:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-IL-1 $\beta$ -Antikörpern (schwarze Pfeile) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): IL-1 $\beta$ -Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen Kontrolle und (B) Kernfärbung. (C): IL-1 $\beta$ -Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen ICS-Maus und (D) Kernfärbung. (E): IL-1 $\beta$ -Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen Kontrolle und (F) Kernfärbung. (G): IL-1 $\beta$ -Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kernfärbung. Originalvergrößerung: x200.

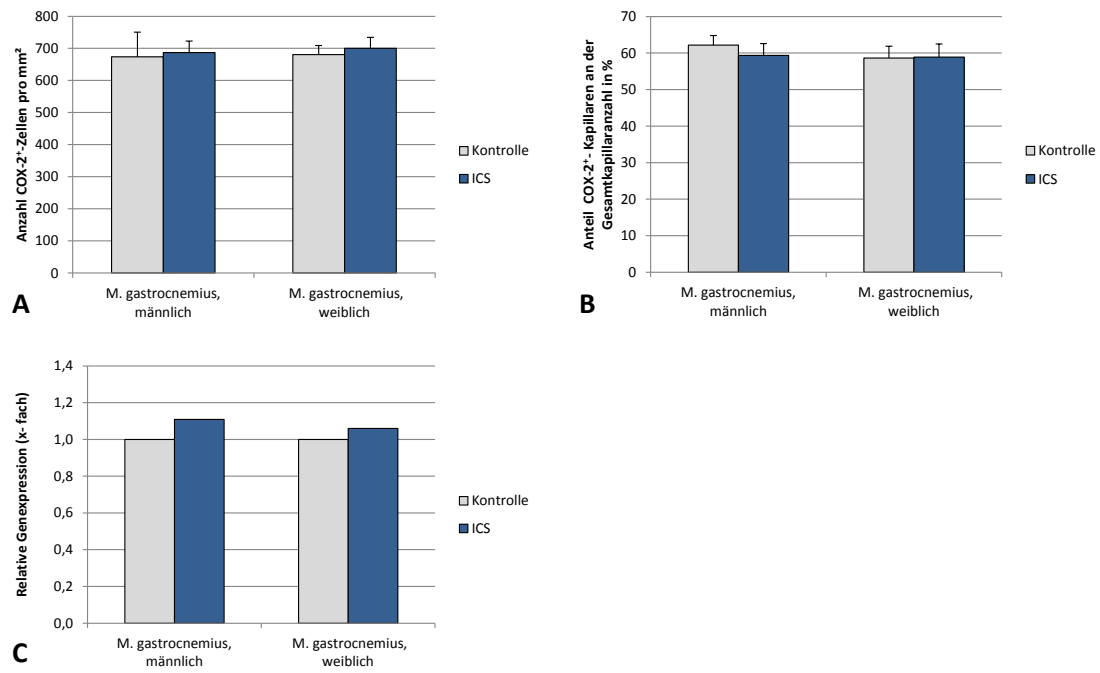


**Anhang B-6:** IL-1 $\beta$  im M. gastrocnemius. (A): Dichte IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>) im M. gastrocnemius. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8., ICS weiblich: n=9. (B): Relative Expression (qRT-PCR) des IL-1 $\beta$ -Gens im M. gastrocnemius von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).



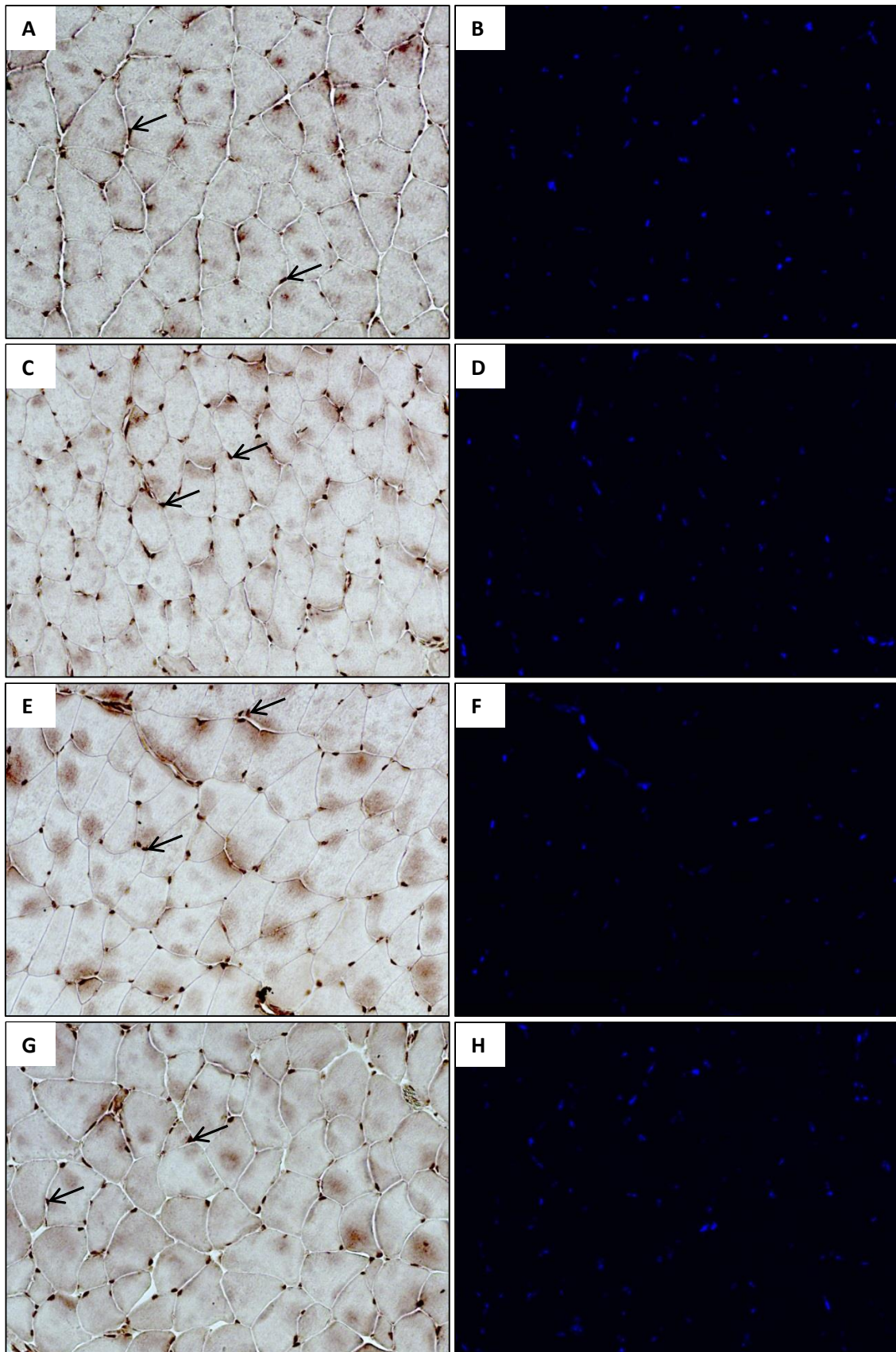


**Anhang B- 7:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-COX-2-Antikörpern (schwarze Pfeile), BSI-Lectin (grün) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): COX-2-Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen Kontrolle und (B) Kern- und Kapillarfärbung. (C): COX-2-Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen ICS-Maus und (D) Kern- und Kapillarfärbung. (E): COX-2-Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen Kontrolle und (F) Kern- und Kapillarfärbung. (G): COX-2-Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kern- und Kapillarfärbung. Originalvergrößerung: x200.

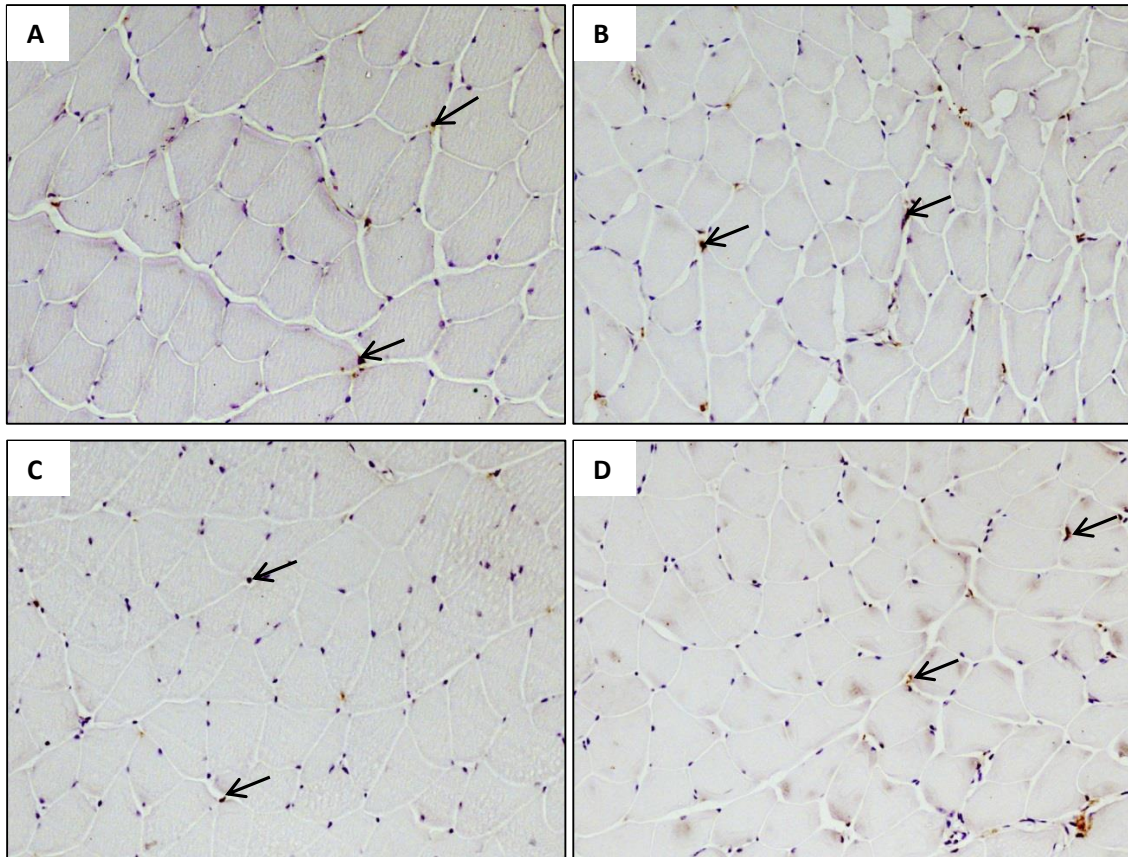


**Anhang B-8:** COX-2 im M. gastrocnemius. (A): Dichte COX-2<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>) (COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren ausgeschlossen). (B): Anteil der COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren an der Gesamtkapillaranzahl (in %). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9. (C): Relative Expression (qRT-PCR) des COX-2-Gens von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrolltieren (auf 1 normiert).

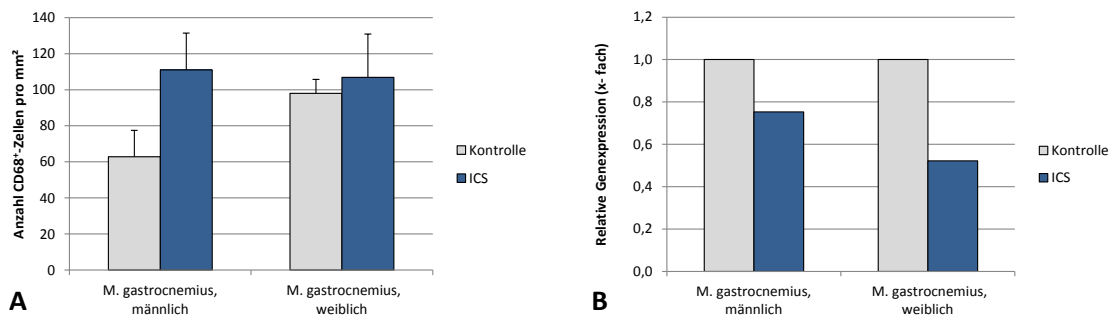




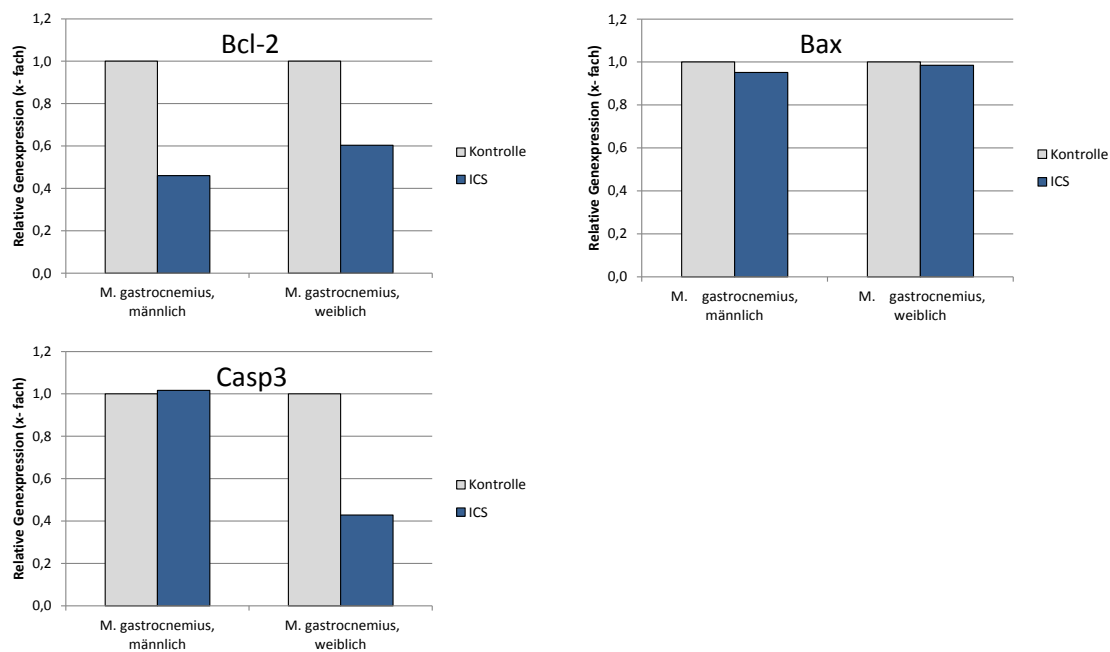
**Anhang B-9:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-MIF-Antikörpern (schwarze Pfeile) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): MIF-Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen Kontrolle und (B) Kernfärbung. (C): MIF-Färbung des M. gastrocnemius einer männlichen ICS-Maus und (D) Kernfärbung. (E): MIF-Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen Kontrolle und (F) Kernfärbung. (G): MIF-Färbung des M. gastrocnemius einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kernfärbung. Originalvergrößerung: x200 (Bonaterra et al., 2016).



**Anhang B-10:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach Färbung mit anti-CD68-Primärantikörpern (schwarze Pfeile). (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D): Weibliche ICS-Maus. Zellkerne sind durch Hämatoxylin (blau) gefärbt. Originalvergrößerung: x200.

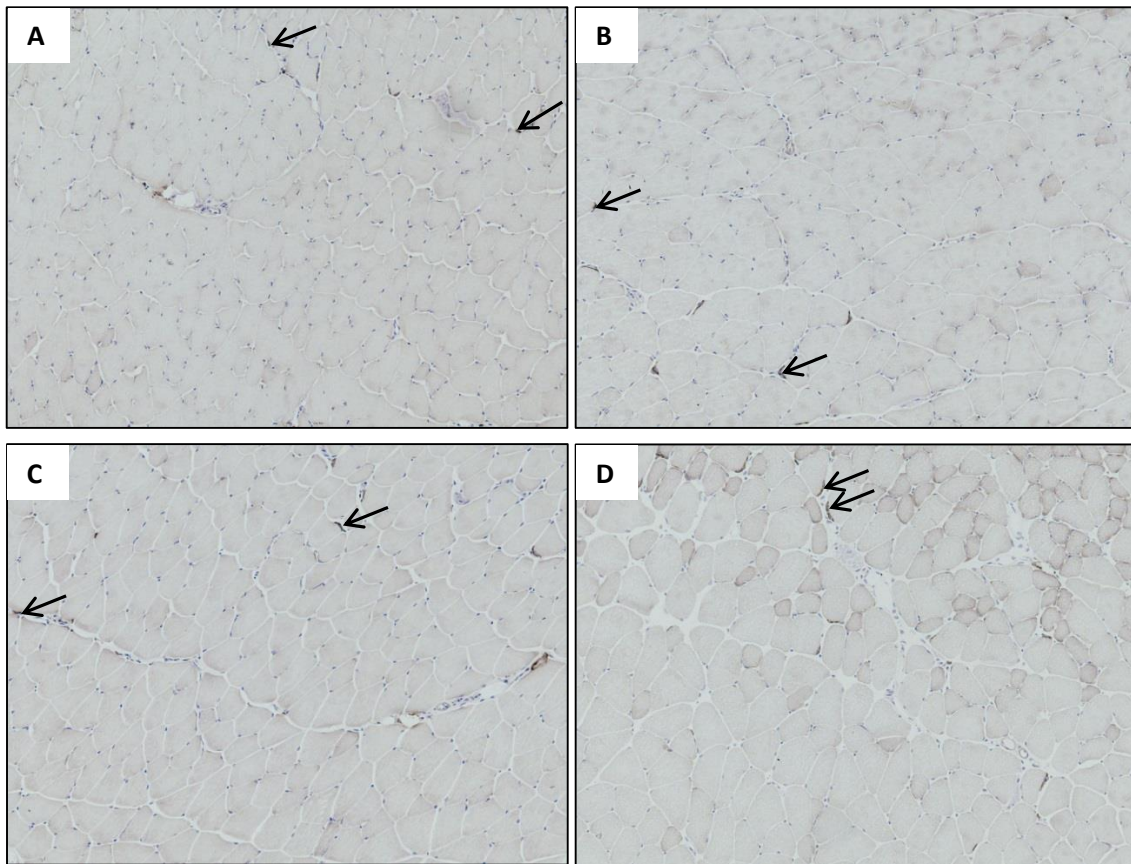


**Anhang B-11:** CD68 im M. gastrocnemius. (A): Dichte CD68<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=7, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=8. (B): Relative Expression (qRT-PCR) des CD68-Gens von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrolltieren (auf 1 normiert).

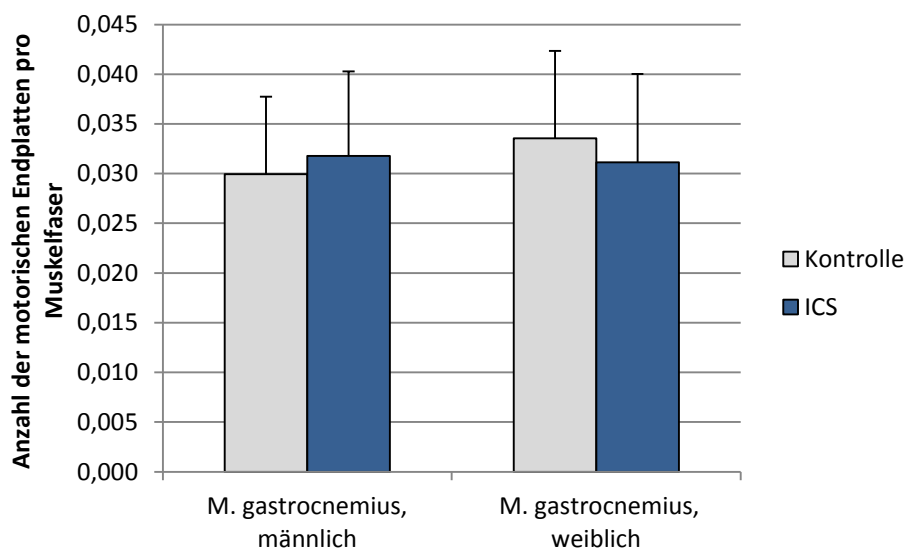


**Anhang B-12:** Relative Expression (qRT-PCR) von Apoptose-relevanten Genen im M. gastrocnemius von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).

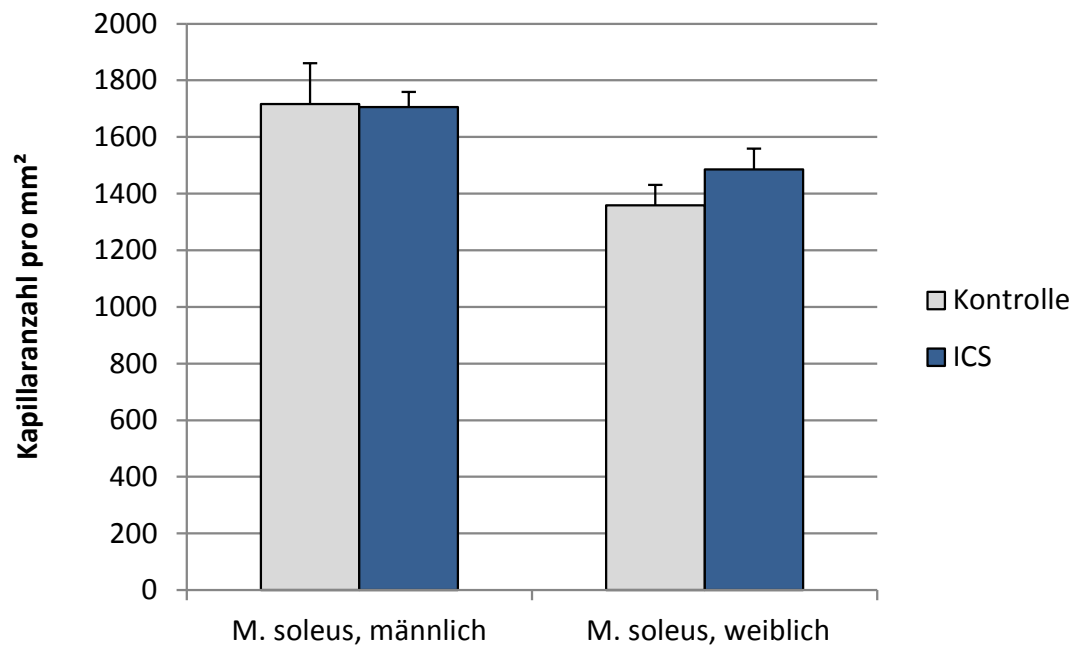




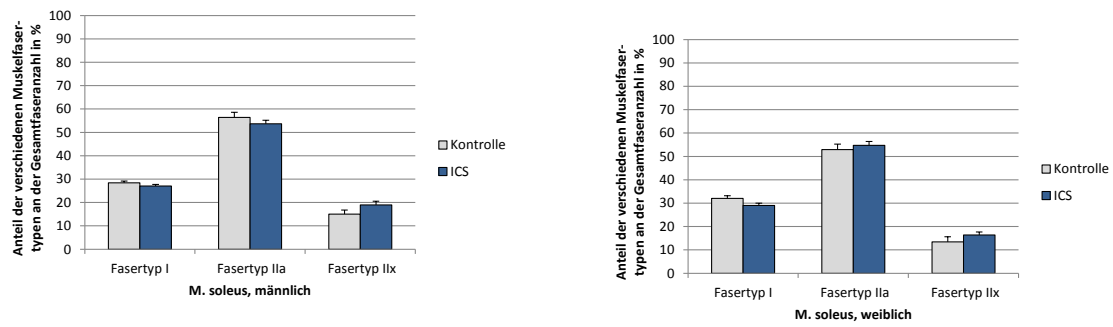
**Anhang B-13:** Exemplarische Querschnitte des M. gastrocnemius nach  $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung zur Darstellung motorischer Endplatten (schwarze Pfeile). (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D): Weibliche ICS-Maus. Zellkerne sind durch Hämatoxylin (blau) gefärbt. Originalvergrößerung: x100.



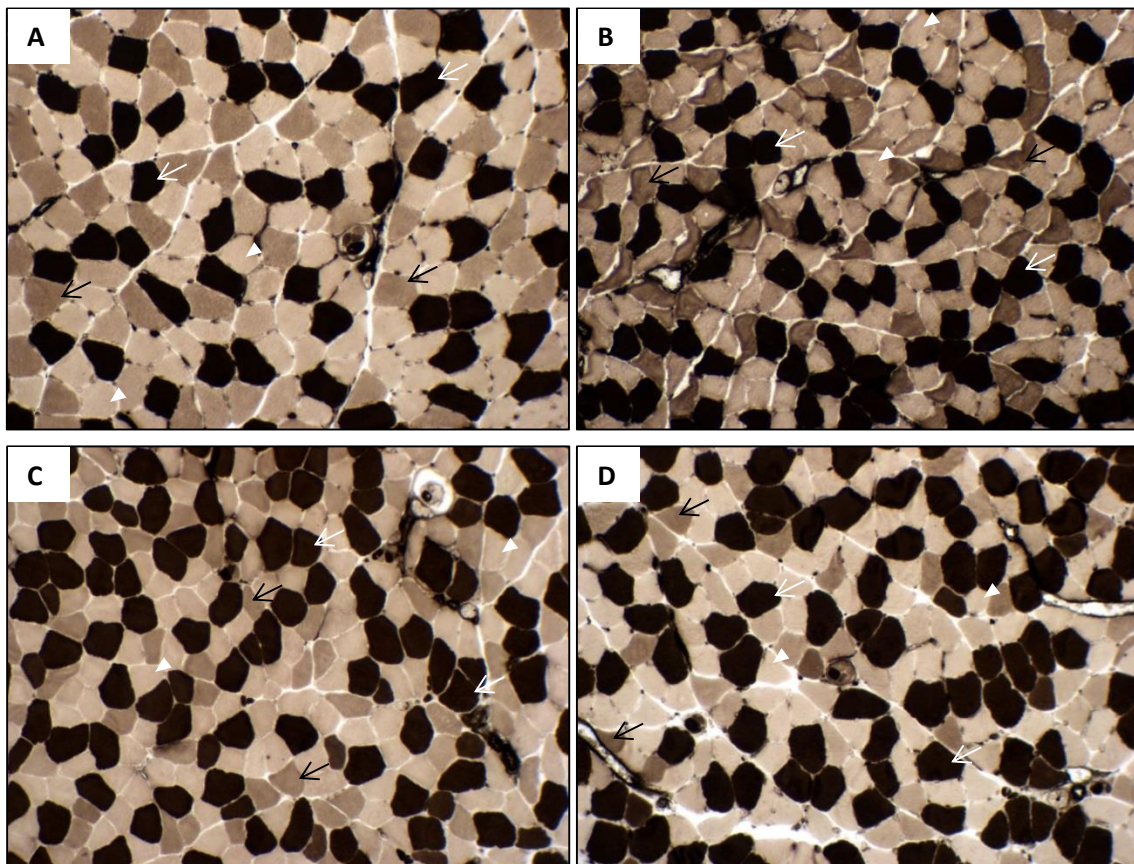
**Anhang B-14:** Motorische Endplatten (n/Muskelfaser) im M. gastrocnemius. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=9, ICS männlich: n=9, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9.

**Anhang C: M. soleus**

**Anhang C-1:** Kapillarisation im M. soleus. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9 (Bonaterra et al., 2016).

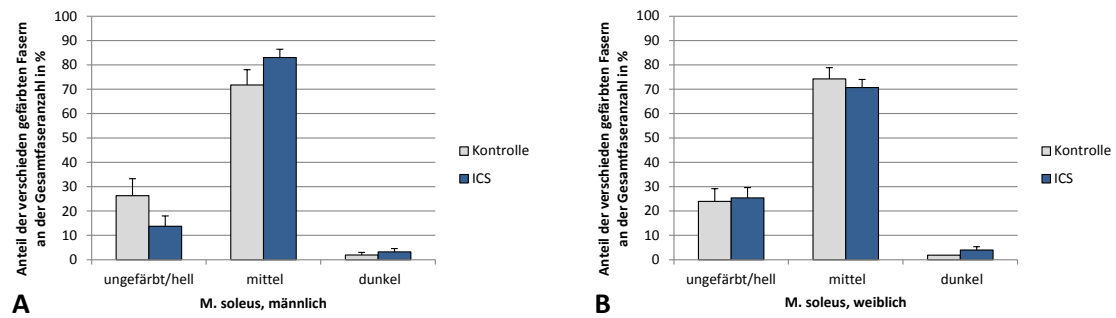


**Anhang C-2:** Anteil der verschiedenen Muskelfasertypen an der Gesamtfaseranzahl (in %) im M. soleus nach ATPase-Färbung. (A): Männliche Tiere. (B): Weibliche Tiere. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=7, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9.

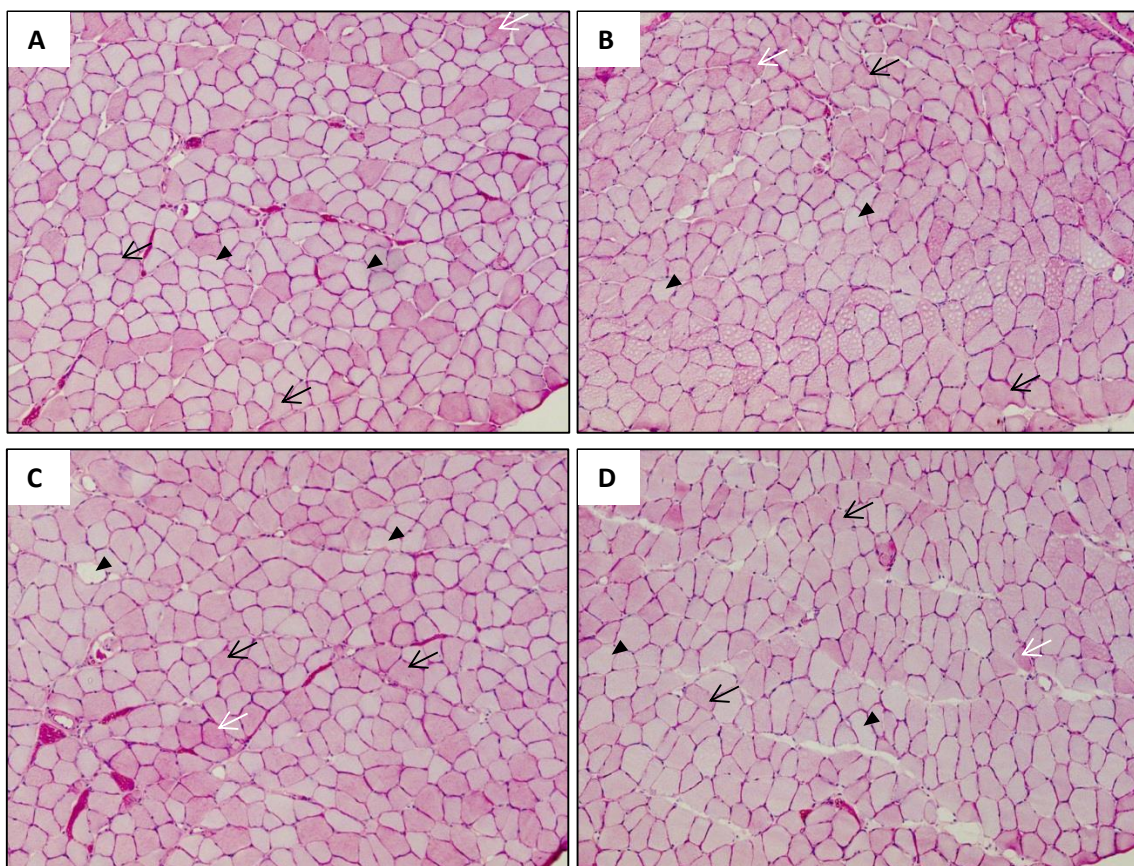


**Anhang C 3:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach ATPase-Färbung. (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D) Weibliche ICS-Maus. Fasertyp I (weiße Pfeile), Fasertyp IIa (weiße Pfeilspitze), Fasertyp IIx (schwarze Pfeile). Originalvergrößerung: x200 (Bonaterra et al., 2016).

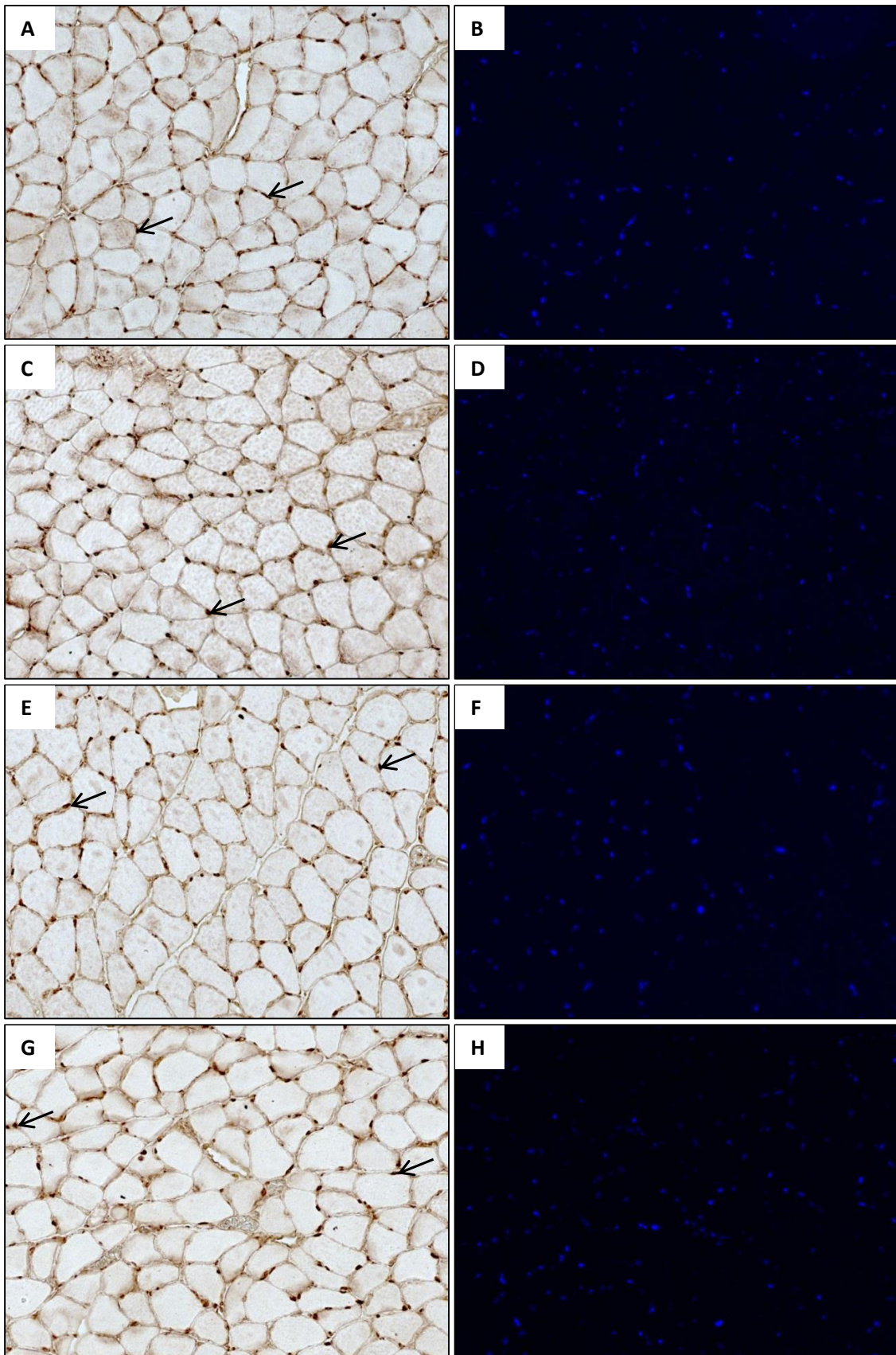




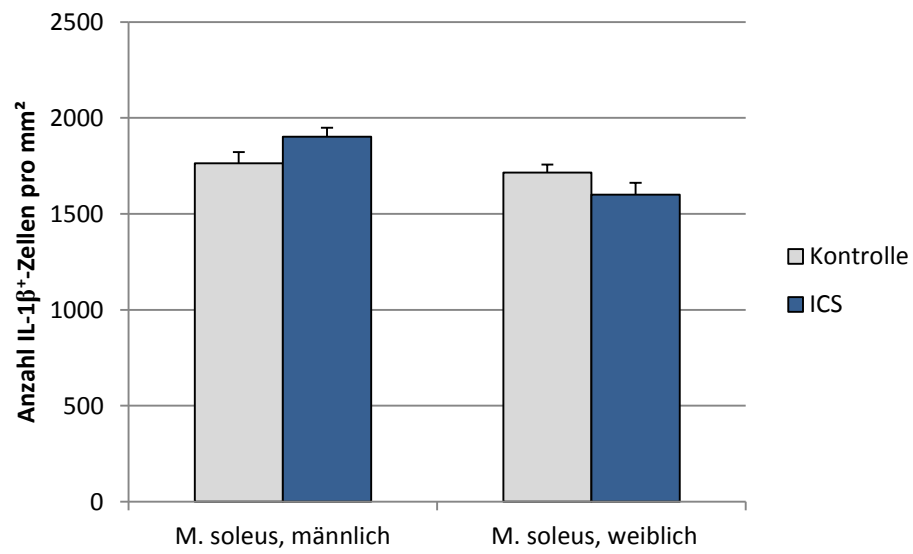
**Anhang C-4:** Anteil der verschieden gefärbten (ungefärbt bzw. hell/mittel/dunkel) Fasern an der Gesamtfaserzahl (in %) nach PAS-Färbung im M. soleus. (A): Männliche Tiere. (B): Weibliche Tiere. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9.



**Anhang C-5:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach PAS-Färbung. (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D) Weibliche ICS-Maus. Dunkle Fasern (weiße Pfeile), mittlere Fasern (schwarze Pfeile), ungefärbte/helle Fasern (schwarze Pfeilspitzen). Originalvergrößerung: x100.

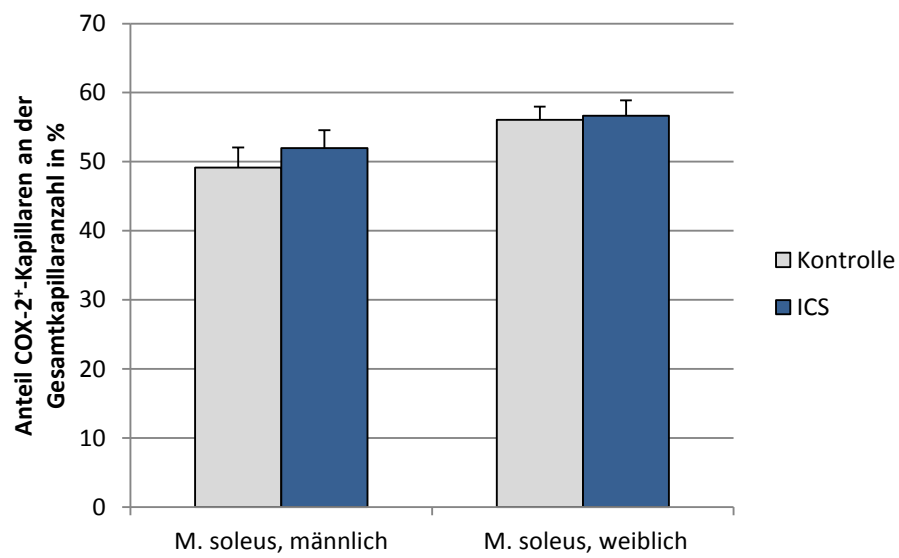


**Anhang C-6:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-IL-1 $\beta$ -Antikörpern (schwarze Pfeile) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): IL-1 $\beta$ -Färbung des M. soleus einer männlichen Kontrolle und (B) Kernfärbung. (C): IL-1 $\beta$ -Färbung des M. soleus einer männlichen ICS-Maus und (D) Kernfärbung. (E): IL-1 $\beta$ -Färbung des M. soleus einer weiblichen Kontrolle und (F) Kernfärbung. (G): IL-1 $\beta$ -Färbung des M. soleus einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kernfärbung. Originalvergrößerung: x200.

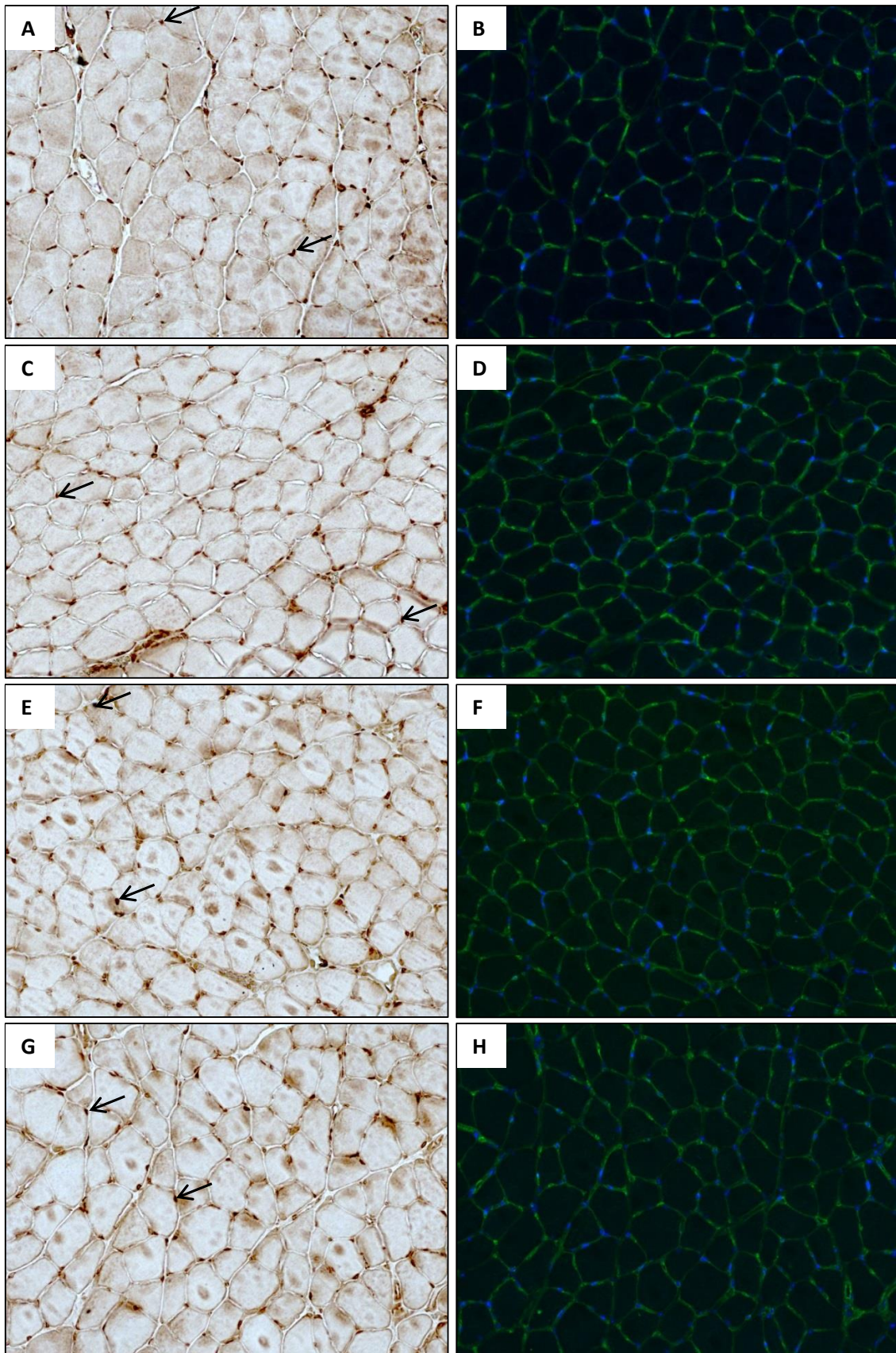


**Anhang C-7:** Dichte IL-1 $\beta$ <sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>) im M. soleus. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9.



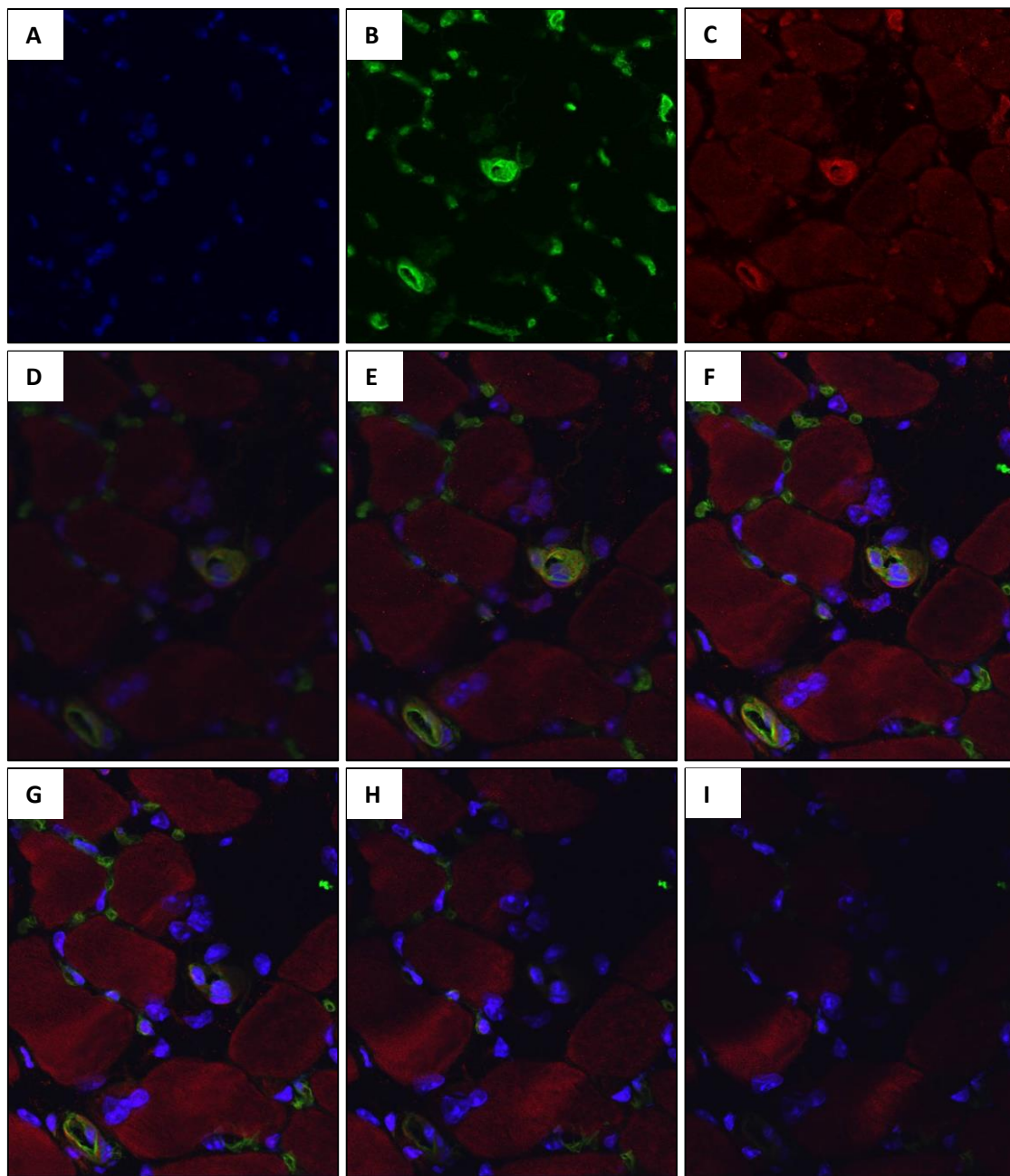


**Anhang C-8:** Anteil COX-2<sup>+</sup>-Kapillaren an der Gesamtkapillaranzahl (in %) im M. soleus. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=9.

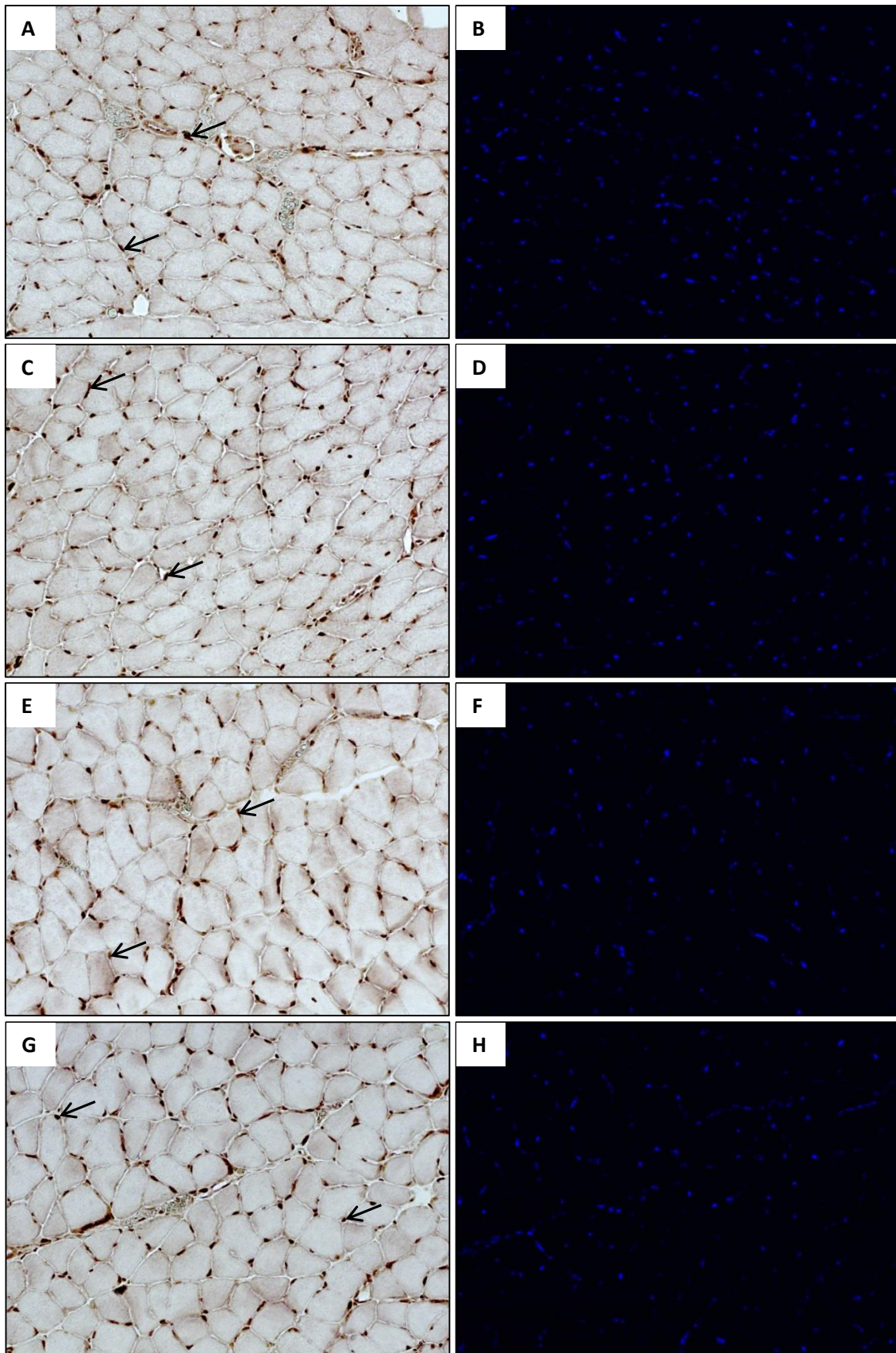


**Anhang C-9:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-COX-2-Antikörpern (schwarze Pfeile), BSI-Lectin (grün) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): COX-2-Färbung des M. soleus einer männlichen Kontrolle und (B) Kern- und Kapillarfärbung. (C): COX-2-Färbung des M. soleus einer männlichen ICS-Maus und (D) Kern- und Kapillarfärbung. (E): COX-2-Färbung des M. soleus einer weiblichen Kontrolle und (F) Kern- und Kapillarfärbung. (G): COX-2-Färbung des M. soleus einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kern- und Kapillarfärbung. Originalvergrößerung: x200.



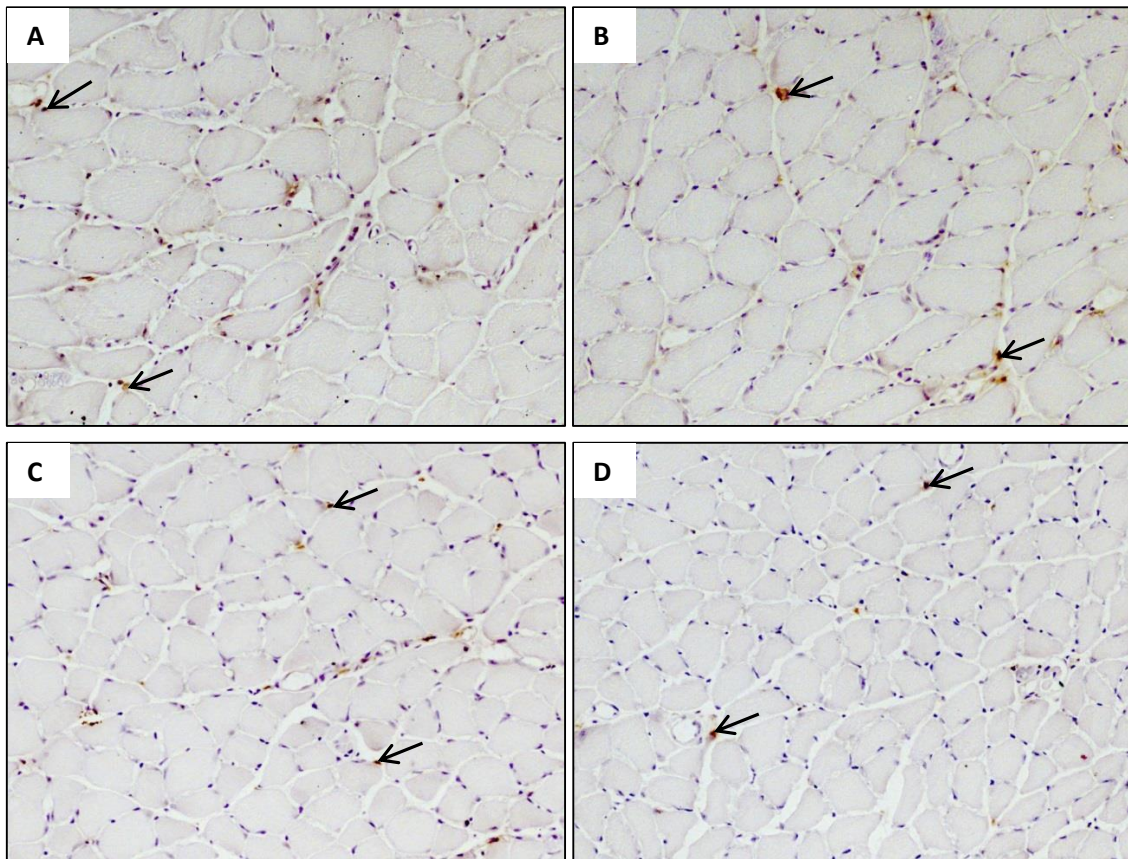


**Anhang C-10:** Beispielaufnahmen mit dem FluoView FV1000 Konfokalmikroskop im M. soleus. (A): Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (B): Biotinyliertes Lectin mit Cy2-konjugiertem Streptavidin zur Kapillardarstellung (grün). (C): Anti-COX-2 mit Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern (rot). (D)-(I): Beispiele der Doppelfärbung mit Hoechst 33342 (blau), biotinyliertem Lectin mit Cy2-konjugiertem Streptavidin (grün) und anti-COX-2 mit Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern (rot) in verschiedenen Schichtebenen. Originalvergrößerung mit Immersionsobjektiv: x630.

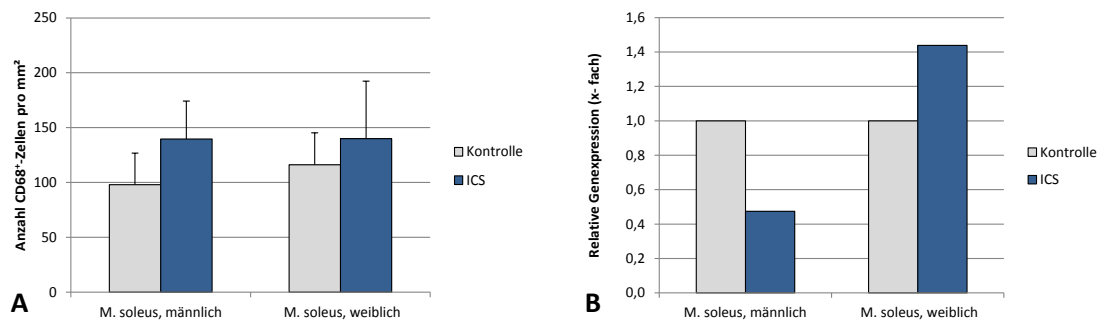


**Anhang C-11:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-MIF-Antikörpern (schwarze Pfeile) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau). (A): MIF-Färbung des M. soleus einer männlichen Kontrolle und (B) Kernfärbung. (C): MIF-Färbung des M. soleus einer männlichen ICS-Maus und (D) Kernfärbung. (E): MIF-Färbung des M. soleus einer weiblichen Kontrolle und (F) Kernfärbung. (G): MIF-Färbung des M. soleus einer weiblichen ICS-Maus und (H) Kernfärbung. Originalvergrößerung: x200.

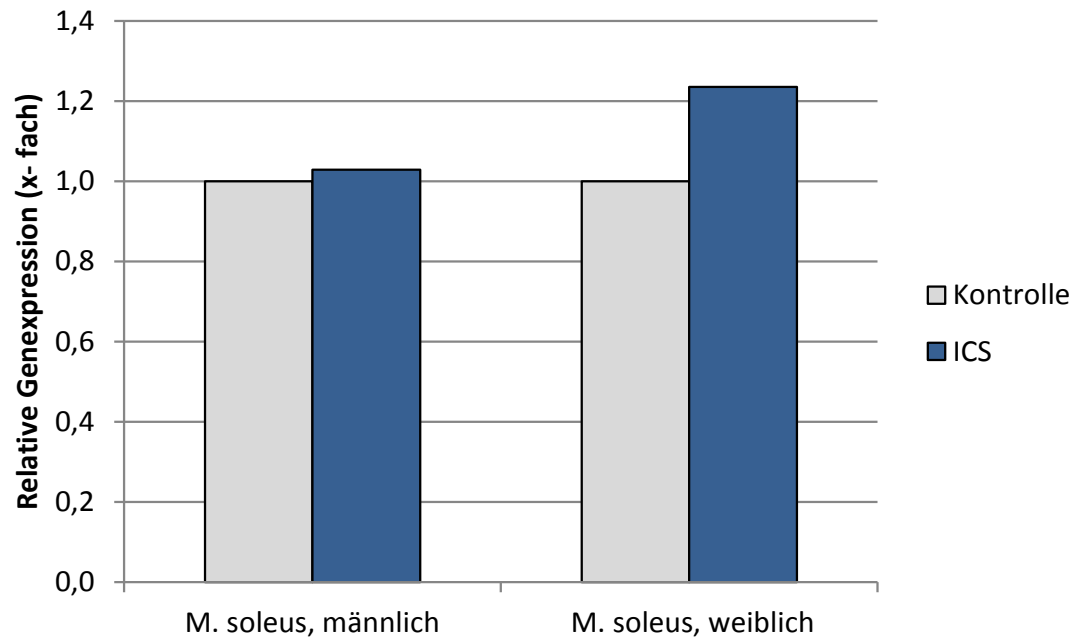




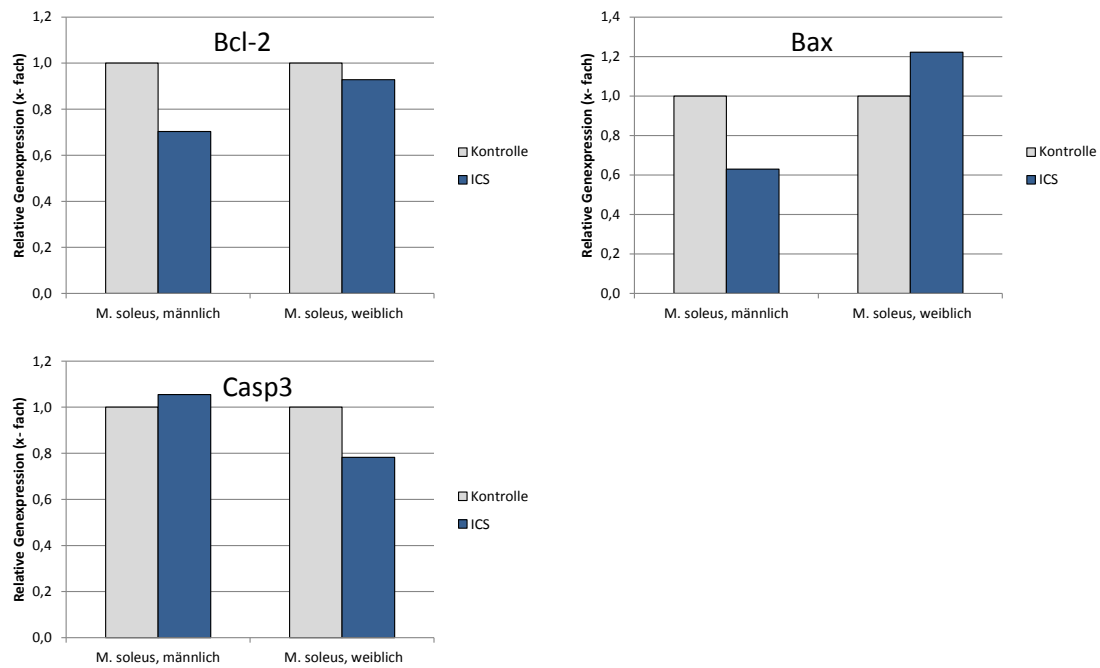
**Anhang C-12:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach Färbung mit anti-CD68-Primärantikörpern (schwarze Pfeile) im M. soleus. (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D): Weibliche ICS-Maus. Zellkerne sind durch Hämatoxylin (blau) gefärbt. Originalvergrößerung: x200.



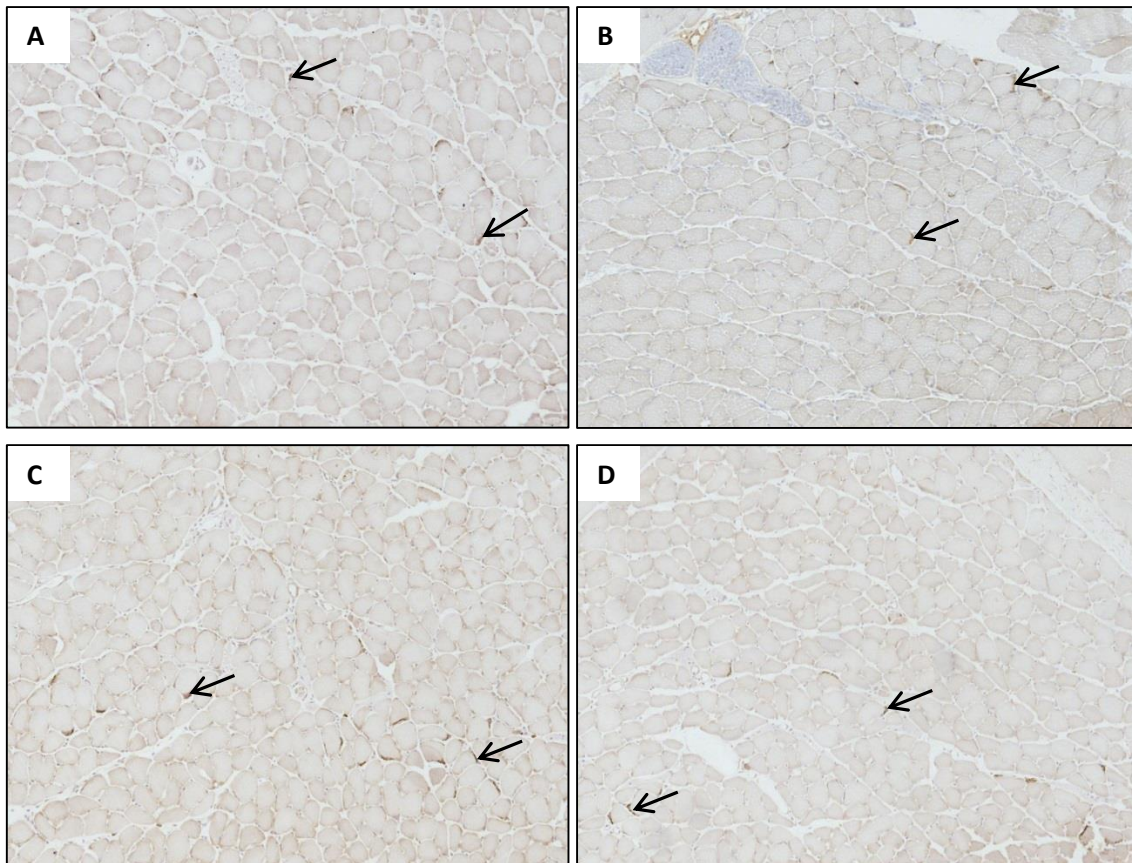
**Anhang C-13:** CD68 im M. soleus. (A): Dichte CD68<sup>+</sup>-Zellen (n/mm<sup>2</sup>). Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich: n=7, ICS männlich: n=8, Kontrolle weiblich: n=8, ICS weiblich: n=8. (B): Relative Expression (qRT-PCR) des CD68-Gens von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrolltieren (auf 1 normiert).



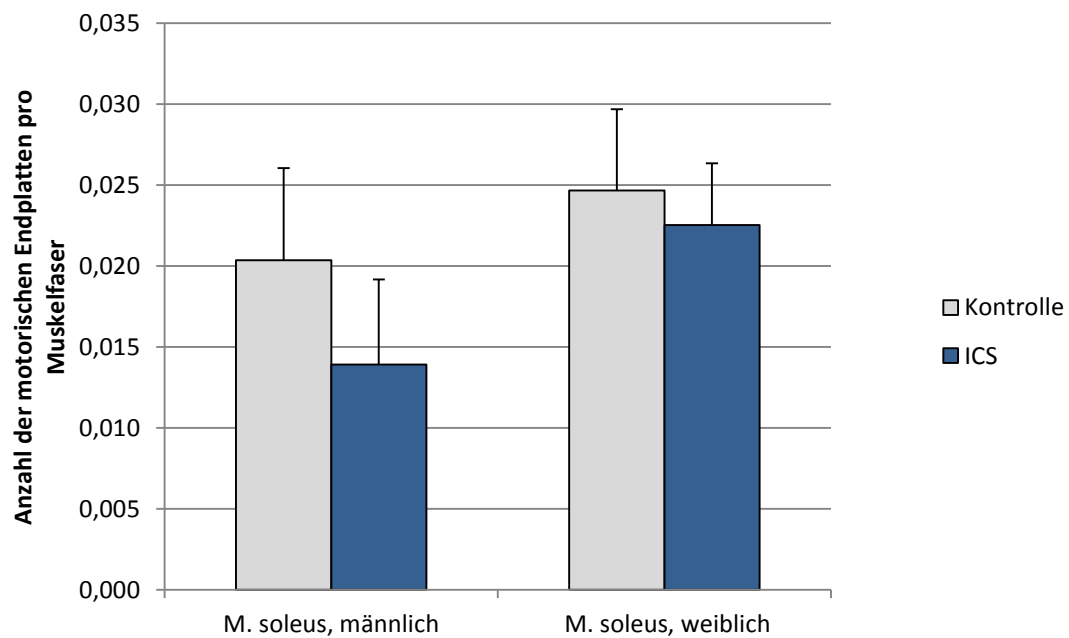
**Anhang C-14:** Relative Expression (qRT-PCR) des TNF-Gens im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).



**Anhang C-15:** Relative Expression (qRT-PCR) von Apoptose-relevanten Genen im M. soleus von männlichen/weiblichen ICS- bzw. Kontrollmäusen (auf 1 normiert).



**Anhang C-16:** Exemplarische Querschnitte des M. soleus nach  $\alpha$ -Bungarotoxin-Färbung zur Darstellung motorischer Endplatten (schwarze Pfeile). (A): Männliche Kontrolle. (B): Männliche ICS-Maus. (C): Weibliche Kontrolle. (D): Weibliche ICS-Maus. Zellkerne sind durch Hämatoxylin (blau) gefärbt. Originalvergrößerung:  $\times 100$ .



**Anhang C-17:** Motorische Endplatten (n/Muskelfaser) im M. soleus. Die Daten zeigen Mittelwerte + SEM. Kontrolle männlich:  $n=7$ , ICS männlich:  $n=8$ , Kontrolle weiblich:  $n=8$ , ICS weiblich:  $n=9$ .

## Literaturverzeichnis

**Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA.**

Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4) [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 548–553, 1998.

**Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N.**

Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling [eng]. *J. Biol. Chem.* 273: 1285–1287, 1998.

**Affaitati G, Costantini R, Fabrizio A, Lapenna D, Tafuri E, Giamberardino MA.**

Effects of treatment of peripheral pain generators in fibromyalgia patients [eng]. *Eur J Pain* 15: 61–69, 2011.

**Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y.**

Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes [eng]. *Cancer Res.* 54: 2468–2471, 1994.

**Albrecht PJ, Hou Q, Argoff CE, Storey JR, Wymer JP, Rice FL.**

Excessive peptidergic sensory innervation of cutaneous arteriole-venule shunts (AVS) in the palmar glabrous skin of fibromyalgia patients: implications for widespread deep tissue pain and fatigue [eng]. *Pain Med* 14: 895–915, 2013.

**Alexander WS.**

Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system [eng]. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 410–416, 2002.

**Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW,**

**Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature [eng]. *Cell* 87: 171, 1996.

**Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF.**

Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets [eng]. *Cancer Res.* 64: 5245–5250, 2004.

**Andersson J, Nagy S, Björk L, Abrams J, Holm S, Andersson U.**

Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level [eng]. *Immunol. Rev.* 127: 69–96, 1992.

**Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, Martinou JC.** Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells [eng]. *J. Biol. Chem.* 276: 11615–11623, 2001.

**Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.** S3-Leitlinie: Definition, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie des Fibromyalgiesyndroms. 01.04.2012. [Online]. [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/041-004I\\_S3\\_Fibromyalgiesyndrom\\_2012-04\\_01.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/041-004I_S3_Fibromyalgiesyndrom_2012-04_01.pdf) [1 Sep. 2015].

**Arend WP, Gordon DF, Wood WM, Janson RW, Joslin FG, Jameel S.** IL-1 beta production in cultured human monocytes is regulated at multiple levels [eng]. *J. Immunol.* 143: 118–126, 1989.

**Arnold LM, Goldenberg DL, Stanford SB, Lalonde JK, Sandhu HS, Keck PE, Welge JA, Bishop F, Stanford KE, Hess EV, Hudson JI.** Gabapentin in the treatment of fibromyalgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial [eng]. *Arthritis Rheum.* 56: 1336–1344, 2007.

**Arnold LM, Hudson JI, Hess EV, Ware AE, Fritz DA, Auchenbach MB, Starck LO, Keck PE.** Family study of fibromyalgia [eng]. *Arthritis Rheum.* 50: 944–952, 2004.

**Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME.** Notch signaling [eng]. *Science* 268: 225–232, 1995.

**Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ.** Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43: 385–406, 2012.

**Ashrafi G, Schwarz TL.** The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria [eng]. *Cell Death Differ.* 20: 31–42, 2013.

**Auernhammer CJ, Bousquet C, Melmed S.** Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6964–6969, 1999.

**Babon JJ, Kershaw NJ, Murphy JM, Varghese LN, Laktyushin A, Young SN, Lucet IS, Norton RS, Nicola NA.** Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity [eng]. *Immunity* 36: 239–250, 2012.



**Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R.** An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 7849–7854, 1996.

**Bachwich PR, Chensue SW, Larrick JW, Kunkel SL.** Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages [eng]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136: 94–101, 1986.

**Bagis S, Tamer L, Sahin G, Bilgin R, Guler H, Ercan B, Erdogan C.** Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: an oxidative stress disorder? [eng]. *Rheumatol. Int.* 25: 188–190, 2005.

**Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D.** Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1 [eng]. *Blood* 87: 3336–3343, 1996.

**Bartoccioni E, Michaelis D, Hohlfeld R.** Constitutive and cytokine-induced production of interleukin-6 by human myoblasts [eng]. *Immunol. Lett.* 42: 135–138, 1994.

**Baugh JA, Bucala R.** Macrophage migration inhibitory factor [ENG]. *Crit. Care Med.* 30: S27-S35, 2002.

**Bazzichi L, Dini M, Rossi A, Corbianco S, Feo F de, Giacomelli C, Zirafa C, Ferrari C, Rossi B, Bombardieri S.** Muscle modifications in fibromyalgic patients revealed by surface electromyography (SEMG) analysis [eng]. *BMC Musculoskelet Disord* 10: 36, 2009.

**Beatus P, Lundkvist J, Oberg C, Lendahl U.** The notch 3 intracellular domain represses notch 1-mediated activation through Hairy/Enhancer of split (HES) promoters [eng]. *Development* 126: 3925–3935, 1999.

**Bengtsson A, Henriksson KG, Larsson J.** Muscle biopsy in primary fibromyalgia. Light-microscopical and histochemical findings [eng]. *Scand. J. Rheumatol.* 15: 1–6, 1986a.

**Bengtsson A, Henriksson KG, Larsson J.** Reduced high-energy phosphate levels in the painful muscles of patients with primary fibromyalgia [eng]. *Arthritis Rheum.* 29: 817–821, 1986b.

**Benigni F, Atsumi T, Calandra T, Metz C, Echtenacher B, Peng T, Bucala R.** The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle [eng]. *J. Clin. Invest.* 106: 1291–1300, 2000.

**Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R.** MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia [eng]. *Nature* 365: 756–759, 1993.

**Bettenhausen B, Hrabě de Angelis M, Simon D, Guénet JL, Gossler A.** Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta [eng]. *Development* 121: 2407–2418, 1995.

**Bjersing JL, Dehlin M, Erlandsson M, Bokarewa MI, Mannerkorpi K.** Changes in pain and insulin-like growth factor 1 in fibromyalgia during exercise: the involvement of cerebrospinal inflammatory factors and neuropeptides [ENG]. *Arthritis Res. Ther.* 14: R162, 2012.

**Black RA, Kronheim SR, Merriam JE, March CJ, Hopp TP.** A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta [eng]. *J. Biol. Chem.* 264: 5323–5326, 1989.

**Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP.** A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells [eng]. *Nature* 385: 729–733, 1997.

**Blanco I, Janciauskiene S, Nita I, Fernández-Bustillo E, Cárcaba V, Gallo C, Alvarez-Rico M, Serres F de, Bérídze N.** Low plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with alpha1-antitrypsin deficiency-related fibromyalgia [eng]. *Clin. Rheumatol.* 29: 189–197, 2010.

**Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S.** Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane [eng]. *Cell* 90: 281–291, 1997.

**Blécourt AC de, Wolf RF, van Rijswijk MH, Kamman RL, Knipping AA, Mooyaart EL.** In vivo <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy (MRS) of tender points in patients with primary fibromyalgia syndrome [eng]. *Rheumatol. Int.* 11: 51–54, 1991.

**Bloom BR, Bennett B.** Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity [eng]. *Science* 153: 80–82, 1966.

**Bodine SC, Baehr LM.** Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1 [eng]. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307: E469-84, 2014.

**Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ.** Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy [eng]. *Science* 294: 1704–1708, 2001a.

**Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD.** Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo [eng]. *Nat. Cell Biol.* 3: 1014–1019, 2001b.

**Böhni U, Lauper M, Locher H.** *Manuelle Medizin 1: Fehlfunktion und Schmerz am Bewegungsorgan verstehen und behandeln* [ger]. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2015.

**Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nuñez G, Thompson CB.** bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death [eng]. *Cell* 74: 597–608, 1993.

**Bonaldo P, Sandri M.** Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy [eng]. *Dis Model Mech* 6: 25–39, 2013.

**Bonaterra GA, Then H, Oezel L, Schwarzbach H, Ocker M, Thieme K, Di Fazio P, Kinscherf R.** Morphological Alterations in Gastrocnemius and Soleus Muscles in Male and Female Mice in a Fibromyalgia Model. *PLoS ONE* 11: e0151116, 2016.

**Bondesen BA, Mills ST, Kegley KM, Pavlath GK.** The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration [eng]. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 287: C475-83, 2004.

**Bondesen BA, Mills ST, Pavlath GK.** The COX-2 pathway regulates growth of atrophied muscle via multiple mechanisms [eng]. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 290: C1651-9, 2006.

**Bondza PK, Metz CN, Akoum A.** Macrophage migration inhibitory factor up-regulates alpha(v)beta(3) integrin and vascular endothelial growth factor expression in endometrial adenocarcinoma cell line Ishikawa [eng]. *J. Reprod. Immunol.* 77: 142–151, 2008.

**Boyd JM, Gallo GJ, Elangovan B, Houghton AB, Malstrom S, Avery BJ, Ebb RG, Subramanian T, Chittenden T, Lutz RJ.** Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins [eng]. *Oncogene* 11: 1921–1928, 1995.

**Bozza M, Kolakowski LF, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, David JR, Gerard C.** Structural characterization and chromosomal location of the mouse macrophage migration inhibitory factor gene and pseudogenes [eng]. *Genomics* 27: 412–419, 1995.

**Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST.** Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines [eng]. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10: 471–480, 1994.

**Bradley LA, Sotolongo A, Alberts KR, Alarcón GS, Mountz JM, Liu H, Kersh BC, Domino ML, DeWaal D, Weigent DA, Blalock JE.** Abnormal Regional Cerebral Blood Flow in the Caudate Nucleus Among Fibromyalgia Patients and Non-Patients Is Associated with Insidious Symptom Onset. *J. Of Musculoskeletal Pain* 7: 285–292, 1999.

**Bricker DK, Taylor EB, Schell JC, Orsak T, Boutron A, Chen Y, Cox JE, Cardon CM, van Vranken JG, Dephoure N, Redin C, Boudina S, Gygi SP, Brivet M, Thummel CS, Rutter J.** A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans [eng]. *Science* 337: 96–100, 2012.

**Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H.** Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 3127–3131, 1990.

**Brooks AJ, Dai W, O'Mara ML, Abankwa D, Chhabra Y, Pelekanos RA, Gardon O, Tunny KA, Blucher KM, Morton CJ, Parker MW, Sierecki E, Gambin Y, Gomez GA, Alexandrov K, Wilson IA, Doxastakis M, Mark AE, Waters MJ.** Mechanism of

activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor [eng]. *Science* 344: 1249783, 2014.

**Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A.** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE [eng]. *Mol. Cell* 5: 207–216, 2000.

**Broussard SR, McCusker RH, Novakofski JE, Strle K, Shen WH, Johnson RW, Dantzer R, Kelley KW.** IL-1beta impairs insulin-like growth factor i-induced differentiation and downstream activation signals of the insulin-like growth factor i receptor in myoblasts [eng]. *J. Immunol.* 172: 7713–7720, 2004.

**Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME.** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor [eng]. *Cell* 96: 857–868, 1999.

**Budarf M, McDonald T, Sellinger B, Kozak C, Graham C, Wistow G.** Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF) to chromosome 22q11.2 [eng]. *Genomics* 39: 235–236, 1997.

**Busam KJ, Bauer TM, Bauer J, Gerok W, Decker K.** Interleukin-6 release by rat liver macrophages [eng]. *J. Hepatol.* 11: 367–373, 1990.

**Buskila D, Neumann L, Hazanov I, Carmi R.** Familial aggregation in the fibromyalgia syndrome [eng]. *Semin. Arthritis Rheum.* 26: 605–611, 1996.

**Cahill CM, Rogers JT.** Interleukin (IL) 1beta induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/IkappaB kinase alpha pathway targeting activator protein-1 [eng]. *J. Biol. Chem.* 283: 25900–25912, 2008.

**Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R.** MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production [eng]. *Nature* 377: 68–71, 1995.

**Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R.** The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor [eng]. *J. Exp. Med.* 179: 1895–1902, 1994.

**Cannon JG, Fielding RA, Fiatarone MA, Orencole SF, Dinarello CA, Evans WJ.** Increased interleukin 1 beta in human skeletal muscle after exercise [eng]. *Am. J. Physiol.* 257: R451-5, 1989.

**Cao F, Hata R, Zhu P, Ma Y, Tanaka J, Hanakawa Y, Hashimoto K, Niinobe M, Yoshikawa K, Sakanaka M.** Overexpression of SOCS3 inhibits astrogliogenesis and promotes maintenance of neural stem cells [eng]. *J. Neurochem.* 98: 459–470, 2006.

**Caro XJ, Winter EF, Dumas AJ.** A subset of fibromyalgia patients have findings suggestive of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and appear to respond to IVIg [eng]. *Rheumatology (Oxford)* 47: 208–211, 2008.

**Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B.** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 3666–3670, 1975.

**Castro-Marrero J, Cordero MD, Sáez-Francas N, Jimenez-Gutierrez C, Aguilar-Montilla FJ, Aliste L, Alegre-Martin J.** Could Mitochondrial Dysfunction Be a Differentiating Marker Between Chronic Fatigue Syndrome and Fibromyalgia? [ENG]. *Antioxid. Redox Signal.*, 2013.

**Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang ML, Trombitas K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H, Labeit S.** Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain [eng]. *J. Mol. Biol.* 306: 717–726, 2001.

**Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA.** Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme [eng]. *Science* 256: 97–100, 1992.

**Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 13926–13931, 2002.

**Chandrasekharan NV, Simmons DL.** The cyclooxygenases [eng]. *Genome Biol.* 5: 241, 2004.

**Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A.** A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein [eng]. *Science* 243: 1576–1583, 1989.

**Cheng Q, McKeown SJ, Santos L, Santiago FS, Khachigian LM, Morand EF, Hickey MJ.** Macrophage migration inhibitory factor increases leukocyte-endothelial interactions in human endothelial cells via promotion of expression of adhesion molecules [eng]. *J. Immunol.* 185: 1238–1247, 2010.

**Chen H, Centola M, Altschul SF, Metzger H.** Characterization of gene expression in resting and activated mast cells [eng]. *J. Exp. Med.* 188: 1657–1668, 1998.

**Chen Q, Fisher DT, Clancy KA, Gauguier JM, Wang W, Unger E, Rose-John S, Andrian UH von, Baumann H, Evans SS.** Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism [eng]. *Nat Immunol* 7: 1299–1308, 2006.

**Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ.** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III [eng]. *J. Biol. Chem.* 278: 36027–36031, 2003.

**Chen S, Jin B, Li Y.** TNF- $\alpha$  regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK [eng]. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 292: C1660-71, 2007.

**Chesney J, Metz C, Bacher M, Peng T, Meinhardt A, Bucala R.** An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma [eng]. *Mol. Med.* 5: 181–191, 1999.

**Chittenden T, Flemington C, Houghton AB, Ebb RG, Gallo GJ, Elangovan B, Chinnadurai G, Lutz RJ.** A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions [eng]. *EMBO J.* 14: 5589–5596, 1995a.

**Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC.** Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak [eng]. *Nature* 374: 733–736, 1995b.

**Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK.** IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* 1: 510–514, 2000.

**Christidis N, Ghafouri B, Larsson A, Palstam A, Mannerkorpi K, Bileviciute-Ljungar I, Löfgren M, Bjersing J, Kosek E, Gerdle B, Ernberg M.** Comparison of the Levels of Pro-Inflammatory Cytokines Released in the Vastus Lateralis Muscle of Patients with Fibromyalgia and Healthy Controls during Contractions of the Quadriceps Muscle – A Microdialysis Study. *PLoS ONE* 10: e0143856, 2015.

**Chung CP, Titova D, Oeser A, Randels M, Avalos I, Milne GL, Morrow JD, Stein CM.** Oxidative stress in fibromyalgia and its relationship to symptoms [eng]. *Clin. Rheumatol.* 28: 435–438, 2009.

**Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, Hershko A.** Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes [eng]. *J. Biol. Chem.* 255: 7525–7528, 1980.

**Ciechanover A, Heller H, Katz-Etzion R, Hershko A.** Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 761–765, 1981.

**Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ.** The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle [eng]. *Cell Metab.* 6: 376–385, 2007.

**Clavel C, Nogueira L, Laurent L, Iobagiu C, Vincent C, Sebbag M, Serre G.** Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcγ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen [eng]. *Arthritis Rheum.* 58: 678–688, 2008.

**Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL.** During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation [eng]. *J. Cell Biol.* 185: 1083–1095, 2009.

**Conlon RA, Reaume AG, Rossant J.** Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites [eng]. *Development* 121: 1533–1545, 1995.

**Cooper GM.** The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Mitochondria. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/> [17 Aug. 2015].



**Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS.** In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle [eng]. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 17): 2895–2901, 1999.

**Cordero MD, Alcocer-Gómez E, Cano-García FJ, Miguel M de, Carrión AM, Navas P, Sánchez Alcázar JA.** Clinical symptoms in fibromyalgia are better associated to lipid peroxidation levels in blood mononuclear cells rather than in plasma [eng]. *PLoS ONE* 6: e26915, 2011.

**Cordero MD, Cano-García FJ, Alcocer-Gómez E, Miguel M de, Sánchez-Alcázar JA.** Oxidative stress correlates with headache symptoms in fibromyalgia: coenzyme Q<sub>10</sub> effect on clinical improvement [eng]. *PLoS ONE* 7: e35677, 2012.

**Cordero MD, Díaz-Parrado E, Carrión AM, Alfonsi S, Sánchez-Alcázar JA, Bullón P, Battino M, Miguel M de.** Is inflammation a mitochondrial dysfunction-dependent event in fibromyalgia? [eng]. *Antioxid. Redox Signal.* 18: 800–807, 2013.

**Cordero MD, Miguel M de, Moreno Fernández AM, Carmona López IM, Garrido Maraver J, Cotán D, Gómez Izquierdo L, Bonal P, Campa F, Bullon P, Navas P, Sánchez Alcázar JA.** Mitochondrial dysfunction and mitophagy activation in blood mononuclear cells of fibromyalgia patients: implications in the pathogenesis of the disease [eng]. *Arthritis Res. Ther.* 12: R17, 2010.

**Cordero MD, Moreno-Fernández AM, deMiguel M, Bonal P, Campa F, Jiménez-Jiménez LM, Ruiz-Losada A, Sánchez-Domínguez B, Sánchez Alcázar JA, Salviati L, Navas P.** Coenzyme Q10 distribution in blood is altered in patients with fibromyalgia [eng]. *Clin. Biochem.* 42: 732–735, 2009.

**Coyle EF, Coggan AR, Hemmert MK, Ivy JL.** Muscle glycogen utilization during prolonged strenuous exercise when fed carbohydrate [eng]. *J. Appl. Physiol.* 61: 165–172, 1986.

**Csibi A, Cornille K, Leibovitch M, Poupon A, Tintignac LA, Sanchez AMJ, Leibovitch SA.** The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse [eng]. *PLoS ONE* 5: e8994, 2010.

**Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM.** Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy [eng]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 49–63, 2014.

**Czerwinski SM, Zak R, Kurowski TT, Falduto MT, Hickson RC.** Myosin heavy chain turnover and glucocorticoid deterrence by exercise in muscle [eng]. *J. Appl. Physiol.* 67: 2311–2315, 1989.

**Dai KS, Liew CC.** A novel human striated muscle RING zinc finger protein, SMRZ, interacts with SMT3b via its RING domain [eng]. *J. Biol. Chem.* 276: 23992–23999, 2001.

**Davey HW, McLachlan MJ, Wilkins RJ, Hilton DJ, Adams TE.** STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver [eng]. *Mol. Cell. Endocrinol.* 158: 111–116, 1999.

**David JR.** Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56: 72–77, 1966.

**Degenhardt K, Sundararajan R, Lindsten T, Thompson C, White E.** Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria [eng]. *J. Biol. Chem.* 277: 14127–14134, 2002.

**Desmeules JA, Cedraschi C, Rapiti E, Baumgartner E, Finckh A, Cohen P, Dayer P, Vischer TL.** Neurophysiologic evidence for a central sensitization in patients with fibromyalgia [eng]. *Arthritis Rheum.* 48: 1420–1429, 2003.

**Diez H, Fischer A, Winkler A, Hu C, Hatzopoulos AK, Breier G, Gessler M.** Hypoxia-mediated activation of DLL4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate [eng]. *Exp. Cell Res.* 313: 1–9, 2007.

**Domijan A, Kovac S, Abramov AY.** Lipid peroxidation is essential for phospholipase C activity and the inositol-trisphosphate-related Ca<sup>2+</sup> signal. *Journal of Cell Science* 127: 21–26, 2014.

**Dong L, Vecchio AJ, Sharma NP, Jurban BJ, Malkowski MG, Smith WL.** Human cyclooxygenase-2 is a sequence homodimer that functions as a conformational heterodimer [eng]. *J Biol Chem* 286: 19035–19046, 2011.

**Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, Bruce LJ, Bucala R.** Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome [eng]. *Nat. Med.* 3: 320–323, 1997.

**Dower SK, Urdal DL.** The interleukin-1 receptor. *Immunology Today* 8: 46–51, 1987.

**Drewes AM, Andreassen A, Schrøder HD, Høgsaa B, Jennum P.** Pathology of skeletal muscle in fibromyalgia: a histo-immuno-chemical and ultrastructural study [eng]. *Br. J. Rheumatol.* 32: 479–483, 1993.

**Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition [eng]. *Cell* 102: 33–42, 2000.

**Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR, Mitch WE.** Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions [eng]. *J. Clin. Invest.* 113: 115–123, 2004.

**Dunwoodie SL, Henrique D, Harrison SM, Beddington RS.** Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo [eng]. *Development* 124: 3065–3076, 1997.

**Dushek S, Mannhart T, Winkelmann A, Merzoug K, Werner NS, Schuepbach D, Montoya P.** Cerebral blood flow dynamics during pain processing in patients with fibromyalgia syndrome [eng]. *Psychosom Med* 74: 802–809, 2012.

**Eich W, Häuser W, Arnold B, Jäckel W, Offenbächer M, Petzke F, Schiltenswolf M, Settan M, Sommer C, Tölle T, Üçeyler N, Henningsen P.** Das Fibromyalgiesyndrom. Definition, Klassifikation, klinische Diagnose und Prognose. *Schmerz* 26: 247–258, 2012.

**Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J.** TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms [eng]. *Cell* 66: 649–661, 1991.

**Elvin A, Siösteen A, Nilsson A, Kosek E.** Decreased muscle blood flow in fibromyalgia patients during standardised muscle exercise: a contrast media enhanced colour Doppler study [eng]. *Eur J Pain* 10: 137–144, 2006.

**Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C, Chavey C, Freidinger K, Hilton DJ, Hotamisligil GS, van Obberghen E.** SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice [eng]. *J. Biol. Chem.* 276: 47944–47949, 2001.

**Ernberg M, Hedenberg-Magnusson B, Alstergren P, Lundeberg T, Kopp S.** Pain, allodynia, and serum serotonin level in orofacial pain of muscular origin [eng]. *J Orofac Pain* 13: 56–62, 1999.

**Esposito LA, Melov S, Panov A, Cottrell BA, Wallace DC.** Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4820–4825, 1999.

**Fehrenbach H, Zissel G, Goldmann T, Tschernig T, Vollmer E, Pabst R, Müller-Quernheim J.** Alveolar macrophages are the main source for tumour necrosis factor-alpha in patients with sarcoidosis [eng]. *Eur. Respir. J.* 21: 421–428, 2003.

**Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES.** CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme [eng]. *J. Biol. Chem.* 269: 30761–30764, 1994.

**Ferrara N, Henzel WJ.** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells [eng]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161: 851–858, 1989.

**Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG.** Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle [eng]. *Am. J. Physiol.* 265: R166–72, 1993.

**Fielitz J, Kim M, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN.** Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3 [eng]. *J. Clin. Invest.* 117: 2486–2495, 2007.

**Filler K, Lyon D, Bennett J, McCain N, Elswick R, Lukkahatai N, Saligan LN.** Association of mitochondrial dysfunction and fatigue: A review of the literature [ENG]. *BBA Clin* 1: 12–23, 2014.

**Finkel T.** Signal transduction by reactive oxygen species [eng]. *J. Cell Biol.* 194: 7–15, 2011.

**Fitzcharles M, Boulos P.** Inaccuracy in the diagnosis of fibromyalgia syndrome: analysis of referrals [eng]. *Rheumatology (Oxford)* 42: 263–267, 2003.

**Foerster BR, Petrou M, Harris RE, Barker PB, Hoeffner EG, Clauw DJ, Sundgren PC.** Cerebral blood flow alterations in pain-processing regions of patients with fibromyalgia using perfusion MR imaging [eng]. *AJNR Am J Neuroradiol* 32: 1873–1878, 2011.

**Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL.** Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 [eng]. *Mol. Cell. Biol.* 16: 4604–4613, 1996.

**Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, Occhipinti A, Jagasia R, Petcherski A, Ruonala MO, Priault M, Salin B, Reichert AS.** Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner [eng]. *Biochim Biophys Acta* 1823: 2297–2310, 2012.

**Fulda S, Debatin K.** Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy [eng]. *Oncogene* 25: 4798–4811, 2006.

**Funk CD.** Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology [eng]. *Science* 294: 1871–1875, 2001.

**Furie MB, McHugh DD.** Migration of neutrophils across endothelial monolayers is stimulated by treatment of the monolayers with interleukin-1 or tumor necrosis factor- $\alpha$  [eng]. *J. Immunol.* 143: 3309–3317, 1989.

**Gadallah NA, Awad MR, Wild KRv, El-Hefnawy HE, El-Arousy NH, El-Hefnawy NG, Abdou TA, El Shafie EA, El Zohiery AK.** Neural and muscular dysfunction in fibromyalgia. *Jpn J Compr Rehabil Sci (Japanese Journal of Comprehensive Rehabilitation Science)* 4: 30–38, 2013.

**Gallagher SR, Desjardins PR.** Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy [eng]. *Curr Protoc Hum Genet* 3: Appendix 3D, 2007.

**Ganter U, Arcone R, Toniatti C, Morrone G, Ciliberto G.** Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6 [eng]. *EMBO J.* 8: 3773–3779, 1989.

**Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, Font de Mora J, Park C, Miele L, Goldstein J, Bonvini E, Porrás A, Laborda J.** Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated

transcription factors and is required for adipogenesis [eng]. *J. Biol. Chem.* 272: 29729–29734, 1997.

**Gardella S, Andrei C, Costigliolo S, Olcese L, Zocchi MR, Rubartelli A.** Secretion of bioactive interleukin-1beta by dendritic cells is modulated by interaction with antigen specific T cells [eng]. *Blood* 95: 3809–3815, 2000.

**Ge H, Nie H, Madeleine P, Danneskiold-Samsøe B, Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L.** Contribution of the local and referred pain from active myofascial trigger points in fibromyalgia syndrome [eng]. *Pain* 147: 233–240, 2009.

**Ge H, Wang Y, Danneskiold-Samsøe B, Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L.** The predetermined sites of examination for tender points in fibromyalgia syndrome are frequently associated with myofascial trigger points [eng]. *J Pain* 11: 644–651, 2010.

**Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N.** Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia [eng]. *J. Biol. Chem.* 272: 23659–23667, 1997.

**Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation [eng]. *J. Biol. Chem.* 273: 30336–30343, 1998.

**Gerdle B, Forsgren MF, Bengtsson A, Leinhard OD, Sören B, Karlsson A, Brandejsky V, Lund E, Lundberg P.** Decreased muscle concentrations of ATP and PCR in the quadriceps muscle of fibromyalgia patients--a <sup>31</sup>P-MRS study [eng]. *Eur J Pain* 17: 1205–1215, 2013.

**Gerdle B, Söderberg K, Salvador Puigvert L, Rosendal L, Larsson B.** Increased interstitial concentrations of pyruvate and lactate in the trapezius muscle of patients with fibromyalgia: a microdialysis study [eng]. *J Rehabil Med* 42: 679–687, 2010.

**Gheita TA, El Sisi RW, Raafat HA, Khalil HM.** Anti-Annexin V Antibodies in Primary Fibromyalgia Syndrome: Relation to Associated Sjögren's Syndrome. *J Clin Immunol* 33: 311–312, 2013.

**Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ.** Janus kinases in immune cell signaling [eng]. *Immunol. Rev.* 228: 273–287, 2009.

**Gielen S, Adams V, Möbius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, Kempf W, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R.** Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure [eng]. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42: 861–868, 2003.

**Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N.** Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants [eng]. *J. Biol. Chem.* 276: 3222–3230, 2001.

**Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G.** Neuropilin-2 and Neuropilin-1 Are Receptors for the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and of Placenta Growth Factor-2, but Only Neuropilin-2 Functions as a Receptor for the 145-Amino Acid Form of VEGF. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18040–18045, 2000.

**Goldenberg DL, Felson DT, Dinerman H.** A randomized, controlled trial of amitriptyline and naproxen in the treatment of patients with fibromyalgia [eng]. *Arthritis Rheum.* 29: 1371–1377, 1986.

**Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L.** During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability [eng]. *Nat Cell Biol* 13: 589–598, 2011.

**Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL.** Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 14440–14445, 2001.

**Gotow T, Shibata M, Kanamori S, Tokuno O, Ohsawa Y, Sato N, Isahara K, Yayoi Y, Watanabe T, Leterrier JF, Linden M, Kominami E, Uchiyama Y.** Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells [eng]. *Cell Death Differ.* 7: 666–674, 2000.

**Gracely RH, Petzke F, Wolf JM, Clauw DJ.** Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia [eng]. *Arthritis Rheum.* 46: 1333–1343, 2002.

**Gray LR, Tompkins SC, Taylor EB.** Regulation of pyruvate metabolism and human disease [eng]. *Cell. Mol. Life Sci.* 71: 2577–2604, 2014.

**Gregory JL, Leech MT, David JR, Yang YH, Dacumos A, Hickey MJ.** Reduced leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice [eng]. *Arthritis Rheum.* 50: 3023–3034, 2004.

**Gronemann ST, Ribel-Madsen S, Bartels EM, Danneskiold-Samsoe B, Bliddal H.** Collagen and muscle pathology in fibromyalgia patients [eng]. *Rheumatology (Oxford)* 43: 27–31, 2004.

**Guedj E, Cammilleri S, Niboyet J, Dupont P, Vidal E, Dropinski J, Mundler O.** Clinical correlate of brain SPECT perfusion abnormalities in fibromyalgia [eng]. *J. Nucl. Med.* 49: 1798–1803, 2008.

**Guedj E, Taieb D, Cammilleri S, Lussato D, Laforte C de, Niboyet J, Mundler O.** 99mTc-ECD brain perfusion SPECT in hyperalgesic fibromyalgia [eng]. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 34: 130–134, 2007.

**Gür A, Karakoç M, Nas K, Remzi, Cevik, Denli A, Saraç J.** Cytokines and depression in cases with fibromyalgia [eng]. *J. Rheumatol.* 29: 358–361, 2002.

**Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT.** Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing [eng]. *Cell Metab.* 1: 401–408, 2005.

**Haas AL, Rose IA.** The mechanism of ubiquitin activating enzyme. A kinetic and equilibrium analysis [eng]. *J. Biol. Chem.* 257: 10329–10337, 1982.

**Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA.** Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation [eng]. *J. Biol. Chem.* 257: 2543–2548, 1982.

**Haddad F, Zaldivar F, Cooper DM, Adams GR.** IL-6-induced skeletal muscle atrophy [eng]. *J. Appl. Physiol.* 98: 911–917, 2005.

**Handler M, Yang X, Shen J.** Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis [eng]. *Development* 127: 2593–2606, 2000.



**Hata AN, Breyer RM.** Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation [eng]. *Pharmacol. Ther.* 103: 147–166, 2004.

**Häuser W, Hayo S, Biewer W, Gesmann M, Kühn-Becker H, Petzke F, Wilmoswky H von, Langhorst J.** Diagnosis of Fibromyalgia Syndrome—A Comparison of Association of the Medical Scientific Societies in Germany, Survey, and American College of Rheumatology Criteria. *The Clinical Journal of Pain* 26: 505–511, 2010.

**Häuser W, Zimmer C, Felde E, Köllner V.** Was sind die Kernsymptome des Fibromyalgiesyndroms? Umfrageergebnisse der Deutschen Fibromyalgievereinigung [ger]. *Schmerz* 22: 176–183, 2008.

**Hernandez ME, Becerril E, Perez M, Leff P, Anton B, Estrada S, Estrada I, Sarasa M, Serrano E, Pavon L.** Proinflammatory cytokine levels in fibromyalgia patients are independent of body mass index [eng]. *BMC Res Notes* 3: 156, 2010.

**Hershko A, Ciechanover A.** The ubiquitin system [eng]. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 425–479, 1998.

**Hershko A, Ciechanover A, Rose IA.** Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown [eng]. *J. Biol. Chem.* 256: 1525–1528, 1981.

**Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A.** Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown [eng]. *J. Biol. Chem.* 258: 8206–8214, 1983.

**Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey J, Zamboni N, Westermann B, Kunji ERS, Martinou J.** Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier [eng]. *Science* 337: 93–96, 2012.

**Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T.** Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130 [eng]. *Cell* 63: 1149–1157, 1990.

**Hicklin DJ, Ellis LM.** Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis [eng]. *J. Clin. Oncol.* 23: 1011–1027, 2005.

**Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions [eng]. *Biotechnology (N.Y.)* 11: 1026–1030, 1993.

**Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA.** Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 114–119, 1998.

**Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, Kishimoto T.** Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis [eng]. *Eur. J. Immunol.* 18: 1797–1801, 1988.

**Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T.** Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2) [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5490–5494, 1985.

**Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A.** Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin [eng]. *Nature* 324: 73–76, 1986.

**Hla T, Neilson K.** Human cyclooxygenase-2 cDNA [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7384–7388, 1992.

**Hoetelmans R, van Slooten HJ, Keijzer R, Erkeland S, van de Velde CJ, Dierendonck JH.** Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells [eng]. *Cell Death Differ.* 7: 384–392, 2000.

**Holderfield MT, Hughes CCW.** Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis [eng]. *Circ. Res.* 102: 637–652, 2008.

**Holz MK, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J.** mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events [eng]. *Cell* 123: 569–580, 2005.

**Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW.** The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA [eng]. *Mol. Endocrinol.* 5: 1806–1814, 1991.

- Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ.** Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3668–3672, 1997.
- Huang JC, Liu DY, Yadollahi S, Wu KK, Dawood MY.** Interleukin-1 beta induces cyclooxygenase-2 gene expression in cultured endometrial stromal cells [eng]. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 538–541, 1998.
- Hüttemann M, Lee I, Samavati L, Yu H, Doan JW.** Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773: 1701–1720, 2007.
- Iannuccelli C, Di Franco M, Alessandri C, Guzzo MP, Croia C, Di Sabato F, Foti M, Valesini G.** Pathophysiology of fibromyalgia: a comparison with the tension-type headache, a localized pain syndrome [eng]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1193: 78–83, 2010.
- Imaizumi T, Itaya H, Fujita K, Kudoh D, Kudoh S, Mori K, Fujimoto K, Matsumiya T, Yoshida H, Satoh K.** Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha [eng]. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 410–415, 2000.
- Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB.** Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Letters* 364: 279–282, 1995.
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A.** Signalling downstream of activated mammalian Notch [eng]. *Nature* 377: 355–358, 1995.
- Jiang Y, Zhang Q, Soderland C, Steinle JJ.** TNF $\alpha$  and SOCS3 regulate IRS-1 to increase retinal endothelial cell apoptosis [eng]. *Cell. Signal.* 24: 1086–1092, 2012.
- Jin J, Han X, Yu Q.** Interleukin-6 induces the generation of IL-10-producing Tr1 cells and suppresses autoimmune tissue inflammation [eng]. *J. Autoimmun.* 40: 28–44, 2013.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.** Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines [eng]. *J. Biol. Chem.* 268: 9049–9054, 1993.
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K.** A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases [eng]. *EMBO J.* 15: 290–298, 1996.

**Joutel A, Andreux F, Gaulis S, Domenga V, Cecillon M, Battail N, Piga N, Chapon F, Godfrain C, Tournier-Lasserre E.** The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients [eng]. *J. Clin. Invest.* 105: 597–605, 2000.

**Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cécillion M, Marechal E, Maciazek J, Vayssiere C, Cruaud C, Cabanis EA, Ruchoux MM, Weissenbach J, Bach JF, Bousser MG, Tournier-Lasserre E.** Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia [eng]. *Nature* 383: 707–710, 1996.

**Jubrias SA, Bennett RM, Klug GA.** Increased incidence of a resonance in the phosphodiester region of <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectra in the skeletal muscle of fibromyalgia patients [eng]. *Arthritis Rheum.* 37: 801–807, 1994.

**Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K.** Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 3566–3570, 1995.

**Kaipainen A, Korhonen J, Pajusola K, Aprelikova O, Persico MG, Terman BI, Alitalo K.** The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells [eng]. *J. Exp. Med.* 178: 2077–2088, 1993.

**Kalyan-Raman UP, Kalyan-Raman K, Yunus MB, Masi AT.** Muscle pathology in primary fibromyalgia syndrome: a light microscopic, histochemical and ultrastructural study [eng]. *J. Rheumatol.* 11: 808–813, 1984.

**Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Yla-Herttuala S, Finegold DN, Ferrell RE, Alitalo K.** A model for gene therapy of human hereditary lymphedema [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 12677–12682, 2001.

**Kato H, Sakai T, Tamura K, Minoguchi S, Shirayoshi Y, Hamada Y, Tsujimoto Y, Honjo T.** Functional conservation of mouse Notch receptor family members [eng]. *FEBS Lett.* 395: 221–224, 1996.

**Kedar V, McDonough H, Arya R, Li H, Rockman HA, Patterson C.** Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 18135–18140, 2004.

**Kelker HC, Oppenheim JD, Stone-Wolff D, Henriksen-DeStefano D, Aggarwal BB, Stevenson HC, Vilcek J.** Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin [eng]. *Int. J. Cancer* 36: 69–73, 1985.

**Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, Neufer PD.** Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content [eng]. *FASEB J.* 15: 2748–2750, 2001.

**Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [eng]. *Br. J. Cancer* 26: 239–257, 1972.

**Kershaw NJ, Murphy JM, Liau NPD, Varghese LN, Laktyushin A, Whitlock EL, Lucet IS, Nicola NA, Babon JJ.** SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition [eng]. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 469–476, 2013.

**Kim H, Park M, Cho M, Yoon C, Lee S, Park S, Leng L, Bucala R, Kang I, Choe J, Kim H.** Macrophage migration inhibitory factor upregulates angiogenic factors and correlates with clinical measures in rheumatoid arthritis [eng]. *J. Rheumatol.* 34: 927–936, 2007.

**Kirkeby S, Mandel U, Vedtofte P.** Identification of capillaries in sections from skeletal muscle by use of lectins and monoclonal antibodies reacting with histo-blood group ABH antigens [eng]. *Glycoconj. J.* 10: 181–188, 1993.

**Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW.** Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges [eng]. *Gene* 285: 1–24, 2002.

**Klemp P, Nielsen HV, Korsgård J, Crone P.** Blood flow in fibromyotic muscles [eng]. *Scand J Rehabil Med* 14: 81–82, 1982.

**Klouche M, Bhakdi S, Hemmes M, Rose-John S.** Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor [eng]. *J. Immunol.* 163: 4583–4589, 1999.

**Köck A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA.** Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light [eng]. *J. Exp. Med.* 172: 1609–1614, 1990.

**Kömhoff M, Gröne HJ, Klein T, Seyberth HW, Nüsing RM.** Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function [eng]. *Am. J. Physiol.* 272: F460-8, 1997.

**Korotkova M, Helmers SB, Loell I, Alexanderson H, Grundtman C, Dorph C, Lundberg IE, Jakobsson P.** Effects of immunosuppressive treatment on microsomal prostaglandin E synthase 1 and cyclooxygenases expression in muscle tissue of patients with polymyositis or dermatomyositis [eng]. *Ann. Rheum. Dis.* 67: 1596–1602, 2008.

**Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T.** Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2 [eng]. *Eur. J. Biochem.* 221: 889–897, 1994.

**Kosek E, Altawil R, Kadetoff D, Finn A, Westman M, Le Maître E, Andersson M, Jensen-Urstad M, Lampa J.** Evidence of different mediators of central inflammation in dysfunctional and inflammatory pain — Interleukin-8 in fibromyalgia and interleukin-1  $\beta$  in rheumatoid arthritis. *Journal of Neuroimmunology* 280: 49–55, 2015.

**Kosek E, Ekholm J, Hansson P.** Sensory dysfunction in fibromyalgia patients with implications for pathogenic mechanisms [eng]. *Pain* 68: 375–383, 1996.

**Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA.** Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 5227–5231, 1989.

**Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T.** Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice [eng]. *Genes Dev.* 14: 1343–1352, 2000.

**Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD.** A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF [eng]. *Cell* 53: 45–53, 1988.

**Kuroda K, Tani S, Tamura K, Minoguchi S, Kurooka H, Honjo T.** Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis [eng]. *J. Biol. Chem.* 274: 7238–7244, 1999.

**Kwiatek R, Barnden L, Tedman R, Jarrett R, Chew J, Rowe C, Pile K.** Regional cerebral blood flow in fibromyalgia: single-photon-emission computed tomography evidence of reduction in the pontine tegmentum and thalami [eng]. *Arthritis Rheum.* 43: 2823–2833, 2000.

**La Pompa JL de, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J, Conlon RA.** Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis [eng]. *Development* 124: 1139–1148, 1997.

**Labeit S, Kohl CH, Witt CC, Labeit D, Jung J, Granzier H.** Modulation of muscle atrophy, fatigue and MLC phosphorylation by MuRF1 as indicated by hindlimb suspension studies on MuRF1-KO mice [eng]. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 693741, 2010.

**Lagirand-Cantaloube J, Cornille K, Csibi A, Batonnet-Pichon S, Leibovitch MP, Leibovitch SA.** Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo [eng]. *PLoS ONE* 4: e4973, 2009.

**Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA.** The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogen1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy [eng]. *EMBO J.* 27: 1266–1276, 2008.

**Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U.** The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium [eng]. *Mech. Dev.* 46: 123–136, 1994.

**Larichaudy J de, Zufferli A, Serra F, Isidori AM, Naro F, Dessalle K, Desgeorges M, Piraud M, Cheillan D, Vidal H, Lefai E, Némot G.** TNF- $\alpha$ - and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism [eng]. *Skelet Muscle* 2: 2, 2012.

**Lautenbacher S, Rollman GB, McCain GA.** Multi-method assessment of experimental and clinical pain in patients with fibromyalgia [eng]. *Pain* 59: 45–53, 1994.

**Lebel E, Vallières L, Rivest S.** Selective involvement of interleukin-6 in the transcriptional activation of the suppressor of cytokine signaling-3 in the brain during systemic immune challenges [eng]. *Endocrinology* 141: 3749–3763, 2000.

**Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL.** Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states [eng]. *J. Nutr.* 129: 227S-237S, 1999.

**Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D.** Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide [eng]. *J. Biol. Chem.* 267: 25934–25938, 1992.

**Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J, Mitch WE.** Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase [eng]. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 1537–1545, 2004.

**Lemasters JJ.** Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [eng]. *Rejuvenation Res* 8: 3–5, 2005.

**Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R.** MIF signal transduction initiated by binding to CD74 [eng]. *J. Exp. Med.* 197: 1467–1476, 2003.

**Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [eng]. *Science* 246: 1306–1309, 1989.

**Li H, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang D, Patterson C.** Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex [eng]. *J. Clin. Invest.* 114: 1058–1071, 2004.

**Lindell L, Bergman S, Petersson IF, Jacobsson LT, Herrström P.** Prevalence of fibromyalgia and chronic widespread pain [eng]. *Scand J Prim Health Care* 18: 149–153, 2000.

**Lindh M, Johansson G, Hedberg M, Henning GB, Grimby G.** Muscle fiber characteristics, capillaries and enzymes in patients with fibromyalgia and controls [eng]. *Scand. J. Rheumatol.* 24: 34–37, 1995.  
<http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/03009749509095152>.



**Lindman R, Hagberg M, Bengtsson A, Henriksson K, Thornell L.** Capillary Structure and Mitochondrial Volume Density in the Trapezius Muscle of Chronic Trapezius Myalgia, Fibromyalgia and Healthy Subjects. *J. Of Musculoskeletal Pain* 3: 5–22, 1995.

**Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G.** Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1 [eng]. *Cell* 80: 909–917, 1995.

**Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade [eng]. *Cell* 91: 479–489, 1997.

**Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X.** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis [eng]. *Cell* 89: 175–184, 1997.

**Liu Z, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, Fairman RM, Velazquez OC, Herlyn M.** Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis [eng]. *Mol. Cell. Biol.* 23: 14–25, 2003.

**Li Y, Hsieh L, Tang R, Liao S, Yeh K.** Interleukin-6 (IL-6) released by macrophages induces IL-6 secretion in the human colon cancer HT-29 cell line [eng]. *Hum. Immunol.* 70: 151–158, 2009.

**Li Y, Lecker SH, Chen Y, Waddell ID, Goldberg AL, Reid MB.** TNF-alpha increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating Ubch2/E220k [eng]. *FASEB J.* 17: 1048–1057, 2003.

**Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ.** Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104: 3219–3224, 2007.

**Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W.** Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor [eng]. *Cell* 61: 351–359, 1990.

**Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israël A.** The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 8108–8112, 1998.

**Long NC, Otterness I, Kunkel SL, Vander AJ, Kluger MJ.** Roles of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor in lipopolysaccharide fever in rats [eng]. *Am. J. Physiol.* 259: R724-8, 1990.

**Lund N, Bengtsson A, Thorborg P.** Muscle tissue oxygen pressure in primary fibromyalgia [eng]. *Scand. J. Rheumatol.* 15: 165–173, 1986.

**Luo B, Aster JC, Hasserjian RP, Kuo F, Sklar J.** Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor [eng]. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6057–6067, 1997.

**Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C, Browner MF.** Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2 [eng]. *Nat. Struct. Biol.* 3: 927–933, 1996.

**Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ.** Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor [eng]. *Cytokine* 4: 96–100, 1992.

**Luther PK.** The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling [eng]. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 30: 171–185, 2009.

**Maes M, Libbrecht I, van Hunsel F, Lin AH, Clerck L de, Stevens W, Kenis G, Jongh R de, Bosmans E, Neels H.** The immune-inflammatory pathophysiology of fibromyalgia: increased serum soluble gp130, the common signal transducer protein of various neurotrophic cytokines [eng]. *Psychoneuroendocrinology* 24: 371–383, 1999.

**Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG.** Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 9267–9271, 1991.

**Maier MM, Gessler M.** Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes [eng]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 652–660, 2000.

**Mailhos C, Modlich U, Lewis J, Harris A, Bicknell R, Ish-Horowicz D.** Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis [eng]. *Differentiation* 69: 135–144, 2001.

**Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, Eriksson U, Alitalo K.** Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1 [eng]. *J. Biol. Chem.* 274: 21217–21222, 1999.

**Manfredi LH, Zanon NM, Garófalo MA, Navegantes LCC, Kettelhut IC.** Effect of short-term cold exposure on skeletal muscle protein breakdown in rats [eng]. *J. Appl. Physiol.* 115: 1496–1505, 2013.

**March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K.** Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs [eng]. *Nature* 315: 641–647, 1985.

**Markworth JF, Cameron-Smith D.** Arachidonic acid supplementation enhances in vitro skeletal muscle cell growth via a COX-2-dependent pathway [eng]. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 304: C56-67, 2013.

**Martin AI, Nieto-Bona MP, Castellero E, Fernandez-Galaz C, Lopez-Menduina M, Gomez-Sanmiguel AB, Gomez-Moreira C, Villanua MA, Lopez-Calderon A.** Effect of cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam, on atrogen-1 and myogenic regulatory factors in skeletal muscle of rats injected with endotoxin [eng]. *J. Physiol. Pharmacol.* 63: 649–659, 2012.

**Martinon F, Burns K, Tschopp J.** The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta [eng]. *Mol. Cell* 10: 417–426, 2002.

**Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J.** Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [eng]. *Nature* 440: 237–241, 2006.

**Martin P, Palmer G, Vigne S, Lamacchia C, Rodriguez E, Talabot-Ayer D, Rose-John S, Chalaris A, Gabay C.** Mouse neutrophils express the decoy type 2 interleukin-1 receptor (IL-1R2) constitutively and in acute inflammatory conditions [eng]. *J. Leukoc. Biol.* 94: 791–802, 2013.

**Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR.** A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 9026–9030, 1991.

**McArdle A, Maglara A, Appleton P, Watson AJ, Grierson I, Jackson MJ.** Apoptosis in multinucleated skeletal muscle myotubes [eng]. *Lab. Invest.* 79: 1069–1076, 1999.

**McBride HM, Neuspiel M, Wasiak S.** Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current Biology* 16: R551, 2006.

**McCord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) [eng]. *J Biol Chem* 244: 6049–6055, 1969.

**McIlwain DR, Berger T, Mak TW.** Caspase functions in cell death and disease [eng]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5: a008656, 2013.

**McIver KL, Evans C, Kraus RM, Ispas L, Sciotti VM, Hickner RC.** NO-mediated alterations in skeletal muscle nutritive blood flow and lactate metabolism in fibromyalgia [eng]. *Pain* 120: 161–169, 2006.

**McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, Ernst M, Topley N, Jones SA.** IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9589–9594, 2005.

**McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI.** A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types [eng]. *EMBO J.* 10: 2821–2832, 1991.

**Medzhitov R.** Origin and physiological roles of inflammation [eng]. *Nature* 454: 428–435, 2008.

**Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT, Mizioro H, Epstein CJ, Wallace DC.** Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 846–851, 1999.

**Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM.** HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance [eng]. *J. Cell. Sci.* 125: 531–537, 2012.

**Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehio C.** A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases [eng]. *EMBO J.* 18: 363–374, 1999.

**Meyer SU, Thirion C, Polesskaya A, Bauersachs S, Kaiser S, Krause S, Pfaffl MW.** TNF- $\alpha$  and IGF1 modify the microRNA signature in skeletal muscle cell differentiation [eng]. *Cell Commun. Signal* 13: 4, 2015.

**Migdal M, Huppertz B, Tessler S, Comforti A, Shibuya M, Reich R, Baumann H, Neufeld G.** Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor [eng]. *J. Biol. Chem.* 273: 22272–22278, 1998.

**Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, Saikumar P.** Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release [eng]. *J. Biol. Chem.* 278: 5367–5376, 2003.

**Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P.** Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane [eng]. *J. Biol. Chem.* 276: 18361–18374, 2001.

**Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Møller NP, Risau W, Ullrich A.** High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis [eng]. *Cell* 72: 835–846, 1993.

**Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, Vane JR.** Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone [eng]. *Br. J. Pharmacol.* 113: 1008–1014, 1994.

**Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R.** Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 345–350, 2002.

**Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R.** Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action [eng]. *J. Biol. Chem.* 274: 18100–18106, 1999.

**Mohr OL.** Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila* [eng]. *Genetics* 4: 275–282, 1919.

**Montserrat-de la Paz S, García-Giménez MD, Ángel-Martín M, Fernández-Arche A.** Validation and additional support for an experimental animal model of fibromyalgia [eng]. *Mod Rheumatol* 25: 116–122, 2015.

**Moriscot AS, Baptista IL, Bogomolovas J, Witt C, Hirner S, Granzier H, Labeit S.** MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance [eng]. *J. Struct. Biol.* 170: 344–353, 2010.

**Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ, Gillis S, Dower SK.** The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor [eng]. *J. Biol. Chem.* 262: 2941–2944, 1987.

**Moss ML, Jin SL, Milla ME, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Warner J, Willard D, Becherer JD.** Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha [eng]. *Nature* 385: 733–736, 1997.

**Mountz JM, Bradley LA, Modell JG, Alexander RW, Triana-Alexander M, Aaron LA, Stewart KE, Alarcón GS, Mountz JD.** Fibromyalgia in women. Abnormalities of regional cerebral blood flow in the thalamus and the caudate nucleus are associated with low pain threshold levels [eng]. *Arthritis Rheum.* 38: 926–938, 1995.

**Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S.** The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding [eng]. *Eur. J. Immunol.* 23: 473–480, 1993.

**Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R.** A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1 [eng]. *Mol. Cell* 5: 197–206, 2000.

**Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL.** Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J* 280: 4131–4148, 2013.

**Murakami M, Zheng Y, Hirashima M, Suda T, Morita Y, Ooehara J, Ema H, Fong G, Shibuya M.** VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment [eng]. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 658–664, 2008.

- Nagata S.** Apoptotic DNA fragmentation [eng]. *Exp. Cell Res.* 256: 12–18, 2000.
- Nakagawa O, McFadden DG, Nakagawa M, Yanagisawa H, Hu T, Srivastava D, Olson EN.** Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13655–13660, 2000.
- Nakai M, Takeda A, Cleary ML, Endo T.** The bcl-2 protein is inserted into the outer membrane but not into the inner membrane of rat liver mitochondria in vitro [eng]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 233–239, 1993.
- Narayana Y, Balaji KN.** NOTCH1 up-regulation and signaling involved in Mycobacterium bovis BCG-induced SOCS3 expression in macrophages [eng]. *J. Biol. Chem.* 283: 12501–12511, 2008.
- Nathan C.** Points of control in inflammation [eng]. *Nature* 420: 846–852, 2002.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [eng]. *FASEB J.* 13: 9–22, 1999.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yaming T, Yu VL, Miller DK.** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis [eng]. *Nature* 376: 37–43, 1995.
- Nickoloff BJ, Qin J, Chaturvedi V, Denning MF, Bonish B, Miele L.** Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma [eng]. *Cell Death Differ.* 9: 842–855, 2002.
- Nicks DK, Beneke WM, Key RM, Timson BF.** Muscle fibre size and number following immobilisation atrophy [eng]. *J. Anat.* 163: 1–5, 1989.
- Nirthanan S, Gwee MCE.** Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on [eng]. *J. Pharmacol. Sci.* 94: 1–17, 2004.
- Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, Bucala R.** Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland [eng]. *Mol. Med.* 1: 781–788, 1995.

**Nishiyori M, Nagai J, Nakazawa T, Ueda H.** Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia [eng]. *Neurosci. Lett.* 472: 184–187, 2010.

**Nishiyori M, Uchida H, Nagai J, Araki K, Mukae T, Kishioka S, Ueda H.** Permanent relief from intermittent cold stress-induced fibromyalgia-like abnormal pain by repeated intrathecal administration of antidepressants [eng]. *Mol Pain* 7: 69, 2011.

**Nishiyori M, Ueda H.** Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia [eng]. *Mol Pain* 4: 52, 2008.

**Novak ML, Billich W, Smith SM, Sukhija KB, McLoughlin TJ, Hornberger TA, Koh TJ.** COX-2 inhibitor reduces skeletal muscle hypertrophy in mice [eng]. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296: R1132-9, 2009.

**Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M.** Soluble cytokine receptors are present in normal human urine [eng]. *J. Exp. Med.* 170: 1409–1414, 1989.

**O'Banion MK, Miller JC, Chang JW, Kaplan MD, Coleman PD.** Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures [eng]. *J. Neurochem.* 66: 2532–2540, 1996.

**O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC.** Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis [eng]. *EMBO J.* 17: 384–395, 1998.

**Oezel L, Then H, Jung AL, Jabari S, Bonaterra GA, Wissniowski TT, Önel SF, Ocker M, Thieme K, Kinscherf R, Di Fazio P.** Fibromyalgia syndrome: metabolic and autophagic processes in intermittent cold stress mice. *Pharmacol Res Perspect* 4: e00248, 2016.

**Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC.** IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade [eng]. *J. Immunol.* 159: 2212–2221, 1997.

**Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M.** A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain [eng]. *J. Biol. Chem.* 273: 31273–31282, 1998.



**Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhäger R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J.** VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane [eng]. *Dev. Biol.* 188: 96–109, 1997.

**Oliveira F de, Quintana HT, Bortolin JA, Gomes OA, Liberti EA, Ribeiro DA.** Cyclooxygenase-2 expression in skeletal muscle of knockout mice suffering Duchenne muscular dystrophy [eng]. *Histochem. Cell Biol.* 139: 685–689, 2013.

**Oliveira SHP, Canetti C, Ribeiro RA, Cunha FQ.** Neutrophil migration induced by IL-1beta depends upon LTB4 released by macrophages and upon TNF-alpha and IL-1beta released by mast cells [eng]. *Inflammation* 31: 36–46, 2008.

**Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U.** Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 11709–11714, 1998.

**Olofsson B, Pajusola K, Euler G von, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U.** Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform [eng]. *J. Biol. Chem.* 271: 19310–19317, 1996a.

**Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, Euler G von, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U.** Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 2576–2581, 1996b.

**Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [eng]. *Cell* 74: 609–619, 1993.

**Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J.** Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis [eng]. *J. Biol. Chem.* 275: 444–450, 2000.

**O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD.** Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway [eng]. *Cell* 109: S121–31, 2002.

**Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM.** NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa [eng]. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2077–2088, 1998.

**Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI.** Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review [eng]. *Blood Cells Mol. Dis.* 38: 258–268, 2007.

**Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N.** Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR [eng]. *J. Biol. Chem.* 269: 25646–25654, 1994.

**Park JH, Phothimat P, Oates CT, Hernanz-Schulman M, Olsen NJ.** Use of P-31 magnetic resonance spectroscopy to detect metabolic abnormalities in muscles of patients with fibromyalgia [eng]. *Arthritis Rheum.* 41: 406–413, 1998.

**Patton LM, Saggart BS, Ahmed NK, Leff JA, Repine JE.** Interleukin-1 beta-induced neutrophil recruitment and acute lung injury in hamsters [eng]. *Inflammation* 19: 23–29, 1995.

**Pay S, Calgüneri M, Çalışkaner Z, Dinç A, Apraş S, Ertenli I, Kiraz S, Cobankara V.** Evaluation of vascular injury with proinflammatory cytokines, thrombomodulin and fibronectin in patients with primary fibromyalgia [eng]. *Nagoya J Med Sci* 63: 115–122, 2000.

**Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Febbraio M, Saltin B.** Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? [eng]. *J Muscle Res Cell Motil* 24: 113–119, 2003.

**Pelosi L, Giacinti C, Nardis C, Borsellino G, Rizzuto E, Nicoletti C, Wannenes F, Battistini L, Rosenthal N, Molinaro M, Musarò A.** Local expression of IGF-1 accelerates muscle regeneration by rapidly modulating inflammatory cytokines and chemokines [eng]. *FASEB J.* 21: 1393–1402, 2007.

**Peng X, Robinson RL, Mease P, Kroenke K, Williams DA, Chen Y, Faries D, Wohlreich M, McCarberg B, Hann D.** Long-term evaluation of opioid treatment in fibromyalgia [eng]. *Clin J Pain* 31: 7–13, 2015.

**Pfeffer G, Chinnery PF.** Diagnosis and treatment of mitochondrial myopathies [eng]. *Ann. Med.* 45: 4–16, 2013.

**Pickart CM, Eddins MJ.** Ubiquitin: structures, functions, mechanisms [eng]. *Biochim. Biophys. Acta* 1695: 55–72, 2004.

**Picot D, Loll PJ, Garavito RM.** The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1 [eng]. *Nature* 367: 243–249, 1994.

**Polge C, Heng A, Jarzaguet M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, Béchet D, Matondo M, Uttenweiler-Joseph S, Monsarrat B, Attaix D, Taillandier D.** Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1 [eng]. *FASEB J.* 25: 3790–3802, 2011.

**Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G.** VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix [eng]. *J. Biol. Chem.* 272: 7151–7158, 1997.

**Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB.** Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis [eng]. *Exp. Cell Res.* 214: 584–594, 1994.

**Pou J, Martínez-González J, Rebollo A, Rodríguez C, Rodríguez-Calvo R, Martín-Fuentes P, Cenarro A, Civeira F, Laguna JC, Alegret M.** Type II interleukin-1 receptor expression is reduced in monocytes/macrophages and atherosclerotic lesions [eng]. *Biochim. Biophys. Acta* 1811: 556–563, 2011.

**Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkovitz C, England BK, Ding X, Phillips LS, Mitch WE.** Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription [eng]. *J. Clin. Invest.* 98: 1703–1708, 1996.

**Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD.** Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates [eng]. *Redox Biol* 1: 304–312, 2013.

**Quinn TP, Peters KG, Vries C de, Ferrara N, Williams LT.** Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7533–7537, 1993.

**Rabuel C, Renaud E, Brealey D, Ratajczak P, Damy T, Alves A, Habib A, Singer M, Payen D, Mebazaa A.** Human septic myopathy: induction of cyclooxygenase, heme oxygenase and activation of the ubiquitin proteolytic pathway [eng]. *Anesthesiology* 101: 583–590, 2004.

- Rahimi N.** The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis [eng]. *Mol. Cancer Ther.* 11: 538–548, 2012.
- Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J.** Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation [eng]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10190–10195, 2011.
- Rand MD, Grimm LM, Artavanis-Tsakonas S, Patriub V, Blacklow SC, Sklar J, Aster JC.** Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors [eng]. *Mol. Cell. Biol.* 20: 1825–1835, 2000.
- Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP.** Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation [eng]. *EMBO J.* 20: 3427–3436, 2001.
- Rao SG, Clauw DJ.** The management of fibromyalgia [eng]. *Drugs Today* 40: 539–554, 2004.
- Reaume AG, Conlon RA, Zirngibl R, Yamaguchi TP, Rossant J.** Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo [eng]. *Dev. Biol.* 154: 377–387, 1992.
- Reed SA, Sandesara PB, Senf SM, Judge AR.** Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy [eng]. *FASEB J.* 26: 987–1000, 2012.
- Reid MB, Li YP.** Tumor necrosis factor- $\alpha$  and muscle wasting: a cellular perspective [eng]. *Respir. Res.* 2: 269–272, 2001.
- Reimann J, Schnell S, Schwartz S, Kappes-Horn K, Dodel R, Bacher M.** Macrophage migration inhibitory factor in normal human skeletal muscle and inflammatory myopathies [eng]. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69: 654–662, 2010.
- Remels AHV, Gosker HR, Verhees KJP, Langen RCJ, Schols AMWJ.** TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation stimulates skeletal muscle glycolytic metabolism through activation of HIF-1 $\alpha$  [eng]. *Endocrinology* 156: 1770–1781, 2015.
- Ren Y, Chan HM, Li Z, Lin C, Nicholls J, Chen CF, Lee PY, Lui V, Bacher M, Tam PKH.** Upregulation of macrophage migration inhibitory factor contributes to induced N-Myc

expression by the activation of ERK signaling pathway and increased expression of interleukin-8 and VEGF in neuroblastoma [eng]. *Oncogene* 23: 4146–4154, 2004.

**Risau W.** Mechanisms of angiogenesis [eng]. *Nature* 386: 671–674, 1997.

**Risau W, Flamme I.** Vasculogenesis [eng]. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 73–91, 1995.

**Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A.** Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment [eng]. *Immunity* 6: 315–325, 1997.

**Rossi AG, Haslett C, Hirani N, Greening AP, Rahman I, Metz CN, Bucala R, Donnelly SC.** Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma [eng]. *J. Clin. Invest.* 101: 2869–2874, 1998.

**Rossi M de, Bernasconi P, Baggi F, Waal Malefyt R de, Mantegazza R.** Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation [eng]. *Int. Immunol.* 12: 1329–1335, 2000.

**Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, Lopez Y, MacKillip F.** Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome [eng]. *Arthritis Rheum.* 37: 1593–1601, 1994.

**Russell IJ, Vaeroy H, Javors M, Nyberg F.** Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis [eng]. *Arthritis Rheum.* 35: 550–556, 1992.

**Rüster M, Franke S, Späth M, Pongratz DE, Stein G, Hein GE.** Detection of elevated N epsilon-carboxymethyllysine levels in muscular tissue and in serum of patients with fibromyalgia [eng]. *Scand. J. Rheumatol.* 34: 460–463, 2005.

**Said FA, Werts C, Elalamy I, Couetil J, Jacquemin C, Hatmi M.** TNF-alpha, inefficient by itself, potentiates IL-1beta-induced PGHS-2 expression in human pulmonary microvascular endothelial cells: requirement of NF-kappaB and p38 MAPK pathways [eng]. *Br. J. Pharmacol.* 136: 1005–1014, 2002.

**Sakahira H, Enari M, Nagata S.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis [eng]. *Nature* 391: 96–99, 1998.

**Salemi S, Rethage J, Wollina U, Michel BA, Gay RE, Gay S, Sprott H.** Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia [eng]. *J. Rheumatol.* 30: 146–150, 2003.

**Sampey AV, Hall PH, Mitchell RA, Metz CN, Morand EF.** Regulation of synoviocyte phospholipase A2 and cyclooxygenase 2 by macrophage migration inhibitory factor [eng]. *Arthritis Rheum.* 44: 1273–1280, 2001.

**Sandri M, Carraro U.** Apoptosis of skeletal muscles during development and disease [eng]. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 1373–1390, 1999.

**Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL.** Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy [eng]. *Cell* 117: 399–412, 2004.

**Schindler C, Darnell JE.** Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway [eng]. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 621–651, 1995.

**Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA.** Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF [eng]. *Blood* 75: 40–47, 1990.

**Schmidt A, Bierwirth S, Weber S, Platen P, Schinköthe T, Bloch W.** Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells [eng]. *Br J Sports Med* 43: 195–198, 2009.

**Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T.** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements [eng]. *BMC Mol. Biol.* 7: 3, 2006.

**Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ.** bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes [eng]. *Cell* 67: 879–888, 1991.

**Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P.** Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metabolism* 7: 33–44, 2008.

**Shang Y, Gurley K, Symons B, Long D, Srikuea R, Crofford LJ, Peterson CA, Yu G.** Noninvasive optical characterization of muscle blood flow, oxygenation, and metabolism in women with fibromyalgia [ENG]. *Arthritis Res. Ther.* 14: R236, 2012.

**Shawber CJ, Das I, Francisco E, Kitajewski J.** Notch signaling in primary endothelial cells [eng]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995: 162–170, 2003.

**Shen W, Li Y, Zhu J, Schwendener R, Huard J.** Interaction between macrophages, TGF-beta1, and the COX-2 pathway during the inflammatory phase of skeletal muscle healing after injury [eng]. *J. Cell. Physiol.* 214: 405–412, 2008.

**Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M.** Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family [eng]. *Oncogene* 5: 519–524, 1990.

**Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, Kintner CR, Stark KL.** Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium [eng]. *Genes Dev.* 14: 1313–1318, 2000.

**Simms RW, Roy SH, Hrovat M, Anderson JJ, Skrinar G, LePoole SR, Zerbini CA, Luca C de, Jolesz F.** Lack of association between fibromyalgia syndrome and abnormalities in muscle energy metabolism [eng]. *Arthritis Rheum.* 37: 794–800, 1994.

**Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK.** Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8946–8950, 1989.

**Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K.** Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6155–6159, 1993.

**Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW.** F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex [eng]. *Cell* 91: 209–219, 1997.

**Smart SJ, Casale TB.** TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent [eng]. *Am. J. Physiol.* 266: L238-45, 1994.

**Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology [eng]. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 145–182, 2000.

**Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide H Synthases (cyclooxygenases)-1 and -2 [eng]. *J. Biol. Chem.* 271: 33157–33160, 1996.

**Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M.** Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor [eng]. *Cell* 92: 735–745, 1998.

**Sommer C, Häuser W, Burgmer M, Engelhardt R, Gerhold K, Petzke F, Schmidt-Wilcke T, Späth M, Tölle T, Uçeyler N, Wang H, Winkelmann A, Thieme K.** Ätiologie und Pathophysiologie des Fibromyalgiesyndroms [ger]. *Schmerz* 26: 259–267, 2012.  
[http://download.springer.com/static/pdf/795/art%253A10.1007%252Fs00482-012-1174-0.pdf?auth66=1360262619\\_4a708a920b27f244db73d14ca7502932&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/795/art%253A10.1007%252Fs00482-012-1174-0.pdf?auth66=1360262619_4a708a920b27f244db73d14ca7502932&ext=.pdf).

**Sörensen J, Bengtsson A, Bäckman E, Henriksson KG, Bengtsson M.** Pain analysis in patients with fibromyalgia. Effects of intravenous morphine, lidocaine, and ketamine [eng]. *Scand. J. Rheumatol.* 24: 360–365, 1995.

**Spencer JA, Eliazer S, Ilaria RL, Richardson JA, Olson EN.** Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein [eng]. *J. Cell Biol.* 150: 771–784, 2000.

**Sprott H, Bradley LA, Oh SJ, Wintersberger W, Alarcón GS, Mussell HG, Tseng A, Gay RE, Gay S.** Immunohistochemical and molecular studies of serotonin, substance P, galanin, pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide, and secretoneurin in fibromyalgic muscle tissue [eng]. *Arthritis Rheum.* 41: 1689–1694, 1998.

**Sprott H, Rzanny R, Reichenbach JR, Kaiser WA, Hein G, Stein G.** <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy in fibromyalgic muscle [eng]. *Rheumatology (Oxford)* 39: 1121–1125, 2000.

**Sprott H, Salemi S, Gay RE, Bradley LA, Alarcón GS, Oh SJ, Michel BA, Gay S.** Increased DNA fragmentation and ultrastructural changes in fibromyalgic muscle fibres [eng]. *Ann. Rheum. Dis.* 63: 245–251, 2004.

**Srikuea R, Symons TB, Long DE, Lee JD, Shang Y, Chomentowski PJ, Yu G, Crofford LJ, Peterson CA.** Association of fibromyalgia with altered skeletal muscle characteristics which may contribute to postexertional fatigue in postmenopausal women [eng]. *Arthritis Rheum.* 65: 519–528, 2013.



**Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization [eng]. *Mol. Cell* 1: 949–957, 1998.

**Stahl A, Joyal J, Chen J, Sapieha P, Juan AM, Hatton CJ, Pei DT, Hurst CG, Seaward MR, Krah NM, Dennison RJ, Greene ER, Boscolo E, Panigrahy D, Smith LEH.** SOCS3 is an endogenous inhibitor of pathologic angiogenesis [eng]. *Blood* 120: 2925–2929, 2012.

**Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S.** Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components [eng]. *Science* 263: 92–95, 1994.

**Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ.** A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling [eng]. *Nature* 387: 917–921, 1997.

**Staud R.** Is it all central sensitization? Role of peripheral tissue nociception in chronic musculoskeletal pain [eng]. *Curr Rheumatol Rep* 12: 448–454, 2010.

**Staud R, Nagel S, Robinson ME, Price DD.** Enhanced central pain processing of fibromyalgia patients is maintained by muscle afferent input: a randomized, double-blind, placebo-controlled study [eng]. *Pain* 145: 96–104, 2009.

**Staud R, Smitherman ML.** Peripheral and central sensitization in fibromyalgia: pathogenetic role [eng]. *Curr Pain Headache Rep* 6: 259–266, 2002.

**Staud R, Vierck CJ, Cannon RL, Mauderli AP, Price DD.** Abnormal sensitization and temporal summation of second pain (wind-up) in patients with fibromyalgia syndrome [eng]. *Pain* 91: 165–175, 2001.

**Stavreus-Evers A, Koraen L, Scott JE, Zhang P, Westlund P.** Distribution of cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, and cytosolic phospholipase A2 in the luteal phase human endometrium and ovary [eng]. *Fertil. Steril.* 83: 156–162, 2005.

**Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio MA, Pedersen BK.** IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in, and release from, contracting human skeletal muscle [eng]. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: E1272-8, 2002.

**Stefano R de, Selvi E, Villanova M, Frati E, Manganelli S, Franceschini E, Biasi G, Marcolongo R.** Image analysis quantification of substance P immunoreactivity in the

trapezius muscle of patients with fibromyalgia and myofascial pain syndrome [eng]. *J. Rheumatol.* 27: 2906–2910, 2000.

**Stern-Straeter J, Bonaterra GA, Hörmann K, Kinscherf R, Goessler UR.** Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts [eng]. *BMC Mol. Biol.* 10: 66, 2009.

**Strobl LJ, Höfelmayr H, Marschall G, Brielmeier M, Bornkamm GW, Zimmer-Strobl U.** Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2 [eng]. *J. Virol.* 74: 1727–1735, 2000.

**Strooper B de, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R.** A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain [eng]. *Nature* 398: 518–522, 1999.

**Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E.** Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5191–5196, 1996a.

**Sun HW, Swope M, Cinquina C, Bedarkar S, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E.** The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer [eng]. *Protein Eng.* 9: 631–635, 1996b.

**Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T.** Notch1 is essential for postimplantation development in mice [eng]. *Genes Dev.* 8: 707–719, 1994.

**Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T.** Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130 [eng]. *Cell* 58: 573–581, 1989.

**Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T.** Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H) [eng]. *Curr. Biol.* 5: 1416–1423, 1995.

**Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel DV.** Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor [eng]. *Cell* 73: 213–216, 1993.

**Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB.** Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase [eng]. *Oncogene* 6: 1677–1683, 1991.

**Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P.** Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor [eng]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 1579–1586, 1992.

**Testa M, Ruvo E de, Russo A, Citterio F, Serino F, Mangoni A, Capogrossi MC, Sperti G.** Induction of interleukin-1beta and interleukin-6 gene expression in hypoperfused skeletal muscle of patients with peripheral arterial disease [eng]. *Ital Heart J* 1: 64–67, 2000.

**Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J.** A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes [eng]. *Nature* 356: 768–774, 1992.

**Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM.** Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal [eng]. *EMBO J.* 19: 94–102, 2000.

**Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA.** Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase [eng]. *J. Biol. Chem.* 280: 2847–2856, 2005.

**Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA.** The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing [eng]. *J. Biol. Chem.* 266: 11947–11954, 1991.

**Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, Taylor RN.** Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis [eng]. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1118–1122, 1996.

**Tseng W, Su C, Tang C.** FAK activation is required for TNF-alpha-induced IL-6 production in myoblasts [eng]. *J. Cell. Physiol.* 223: 389–396, 2010.

**Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM.** Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation [eng]. *Science* 226: 1097–1099, 1984.

**Tumanov AV, Grivennikov SI, Kruglov AA, Shebzukhov YV, Koroleva EP, Piao Y, Cui C, Kuprash DV, Nedospasov SA.** Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs [eng]. *Blood* 116: 3456–3464, 2010.

**Uçeyler N, Häuser W, Sommer C.** Systematic review with meta-analysis: cytokines in fibromyalgia syndrome [eng]. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 245, 2011.

**Uçeyler N, Valenza R, Stock M, Schedel R, Sprotte G, Sommer C.** Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain [eng]. *Arthritis Rheum.* 54: 2656–2664, 2006.

**Uçeyler N, Zeller D, Kahn A, Kewenig S, Kittel-Schneider S, Schmid A, Casanova-Molla J, Reiners K, Sommer C.** Small fibre pathology in patients with fibromyalgia syndrome [ENG]. *Brain*, 2013.

**Uehara A, Gottschall PE, Dahl RR, Arimura A.** Interleukin-1 stimulates ACTH release by an indirect action which requires endogenous corticotropin releasing factor [eng]. *Endocrinology* 121: 1580–1582, 1987a.

**Uehara A, Gottschall PE, Dahl RR, Arimura A.** Stimulation of ACTH release by human interleukin-1 beta, but not by interleukin-1 alpha, in conscious, freely-moving rats [eng]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 1286–1290, 1987b.

**Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J.** Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene [eng]. *Development* 122: 2251–2259, 1996.

**Vaerø H, Helle R, Førre O, Kåss E, Terenius L.** Elevated CSF levels of substance P and high incidence of Raynaud phenomenon in patients with fibromyalgia: new features for diagnosis [eng]. *Pain* 32: 21–26, 1988.

**van der Donk WA, Tsai A, Kulmacz RJ.** The cyclooxygenase reaction mechanism [eng]. *Biochemistry* 41: 15451–15458, 2002.

**Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W.** Two tumour necrosis factor receptors: structure and function [eng]. *Trends Cell Biol.* 5: 392–399, 1995.

**Walenga RW, Kester M, Coroneos E, Butcher S, Dwivedi R, Statt C.** Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro [eng]. *Prostaglandins* 52: 341–359, 1996.

**Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hallegua D, Silverman S, Silver D, Weisman MH.** Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study [eng]. *Rheumatology (Oxford)* 40: 743–749, 2001.

**Wallweber HJA, Tam C, Franke Y, Starovasnik MA, Lupardus PJ.** Structural basis of recognition of interferon- $\alpha$  receptor by tyrosine kinase 2. *Nat Struct Mol Biol* 21: 443–448, 2014.

**Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH.** Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor [eng]. *J. Biol. Chem.* 269: 26988–26995, 1994.

**Wang H, Moser M, Schiltenswolf M, Buchner M.** Circulating cytokine levels compared to pain in patients with fibromyalgia -- a prospective longitudinal study over 6 months [eng]. *J. Rheumatol.* 35: 1366–1370, 2008a.

**Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ.** BID: a novel BH3 domain-only death agonist [eng]. *Genes Dev.* 10: 2859–2869, 1996.

**Wang L, Du F, Wang X.** TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways [eng]. *Cell* 133: 693–703, 2008b.

**Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK.** ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy [eng]. *Autophagy* 8: 1462–1476, 2012.

**Weber M, Kinscherf R, Krakowski-Roosen H, Aulmann M, Renk H, Künkele A, Edler L, Kauczor H, Hildebrandt W.** Myoglobin plasma level related to muscle mass and fiber composition: a clinical marker of muscle wasting? [eng]. *J. Mol. Med.* 85: 887–896, 2007.

**Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G.** Notch2: a second mammalian Notch gene [eng]. *Development* 116: 931–941, 1992.

**Weiser WY, Temple PA, Witek-Giannotti JS, Remold HG, Clark SC, David JR.** Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 7522–7526, 1989.

**Weisiger RA, Fridovich I.** Superoxide dismutase. Organelle specificity [eng]. *J Biol Chem* 248: 3582–3592, 1973.

**White KP, Speechley M, Harth M, Ostbye T.** The London Fibromyalgia Epidemiology Study: the prevalence of fibromyalgia syndrome in London, Ontario [eng]. *J. Rheumatol.* 26: 1570–1576, 1999.

**Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zürcher G, Ziemiecki A.** Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase [eng]. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2057–2065, 1991.

**Williams CK, Li J, Murga M, Harris AL, Tosato G.** Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function [eng]. *Blood* 107: 931–939, 2006.

**Wing SS, Goldberg AL.** Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting [eng]. *Am. J. Physiol.* 264: E668-76, 1993.

**Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA.** Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1 [eng]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 3071–3076, 1999.

**Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles M, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB, Yunus MB.** The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity [eng]. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 62: 600–610, 2010. [http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/acr.20140/asset/20140\\_ftp.pdf?v=1&t=hcgft9ue&s=6898540b68819f032401c75849f989a418892182](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/acr.20140/asset/20140_ftp.pdf?v=1&t=hcgft9ue&s=6898540b68819f032401c75849f989a418892182).

**Wolfe F, Ross K, Anderson J, Russell IJ, Hebert L.** The prevalence and characteristics of fibromyalgia in the general population [eng]. *Arthritis Rheum.* 38: 19–28, 1995.

**Wolfe F, Smythe HA, Yunus MB, Bennett RM, Bombardier C, Goldenberg DL, Tugwell P, Campbell SM, Abeles M, Clark P.** The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee [eng]. *Arthritis Rheum.* 33: 160–172, 1990.

**Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ.** Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis [eng]. *J. Cell Biol.* 139: 1281–1292, 1997.

**Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, Shibuya M.** A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1) [eng]. *Oncogene* 9: 2683–2690, 1994.

**Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T.** Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor [eng]. *Science* 241: 825–828, 1988.

**Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T.** Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2) [eng]. *J. Biol. Chem.* 278: 51985–51988, 2003.

**Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T.** Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165 [eng]. *Biochemistry* 44: 8858–8864, 2005.

**Yan SF, Tritto I, Pinsky D, Liao H, Huang J, Fuller G, Brett J, May L, Stern D.** Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6 [eng]. *J. Biol. Chem.* 270: 11463–11471, 1995.

**Yokogami K, Yamashita S, Takeshima H.** Hypoxia-induced decreases in SOCS3 increase STAT3 activation and upregulate VEGF gene expression [eng]. *Brain Tumor Pathol* 30: 135–143, 2013.

**Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A.** A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors [eng]. *EMBO J.* 14: 2816–2826, 1995.

**Yunus MB, Kalyan-Raman UP, Kalyan-Raman K, Masi AT.** Pathologic changes in muscle in primary fibromyalgia syndrome [eng]. *Am. J. Med.* 81: 38–42, 1986.

**Yunus MB, Kalyan-Raman UP, Masi AT, Aldag JC.** Electron microscopic studies of muscle biopsy in primary fibromyalgia syndrome: a controlled and blinded study [eng]. *J. Rheumatol.* 16: 97–101, 1989a.

**Yunus MB, Masi AT, Aldag JC.** Short term effects of ibuprofen in primary fibromyalgia syndrome: a double blind, placebo controlled trial [eng]. *J. Rheumatol.* 16: 527–532, 1989b.

**Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D.** Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) peceptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways [eng]. *J. Biol. Chem.* 276: 26969–26979, 2001.

**Zha H, Aimé-Sempé C, Sato T, Reed JC.** Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2 [eng]. *J. Biol. Chem.* 271: 7440–7444, 1996.

**Zhang C, Li Y, Wu Y, Wang L, Wang X, Du J.** Interleukin-6/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Pathway Is Essential for Macrophage Infiltration and Myoblast Proliferation during Muscle Regeneration. *Journal of Biological Chemistry* 288: 1489–1499, 2013.

**Zhang Y, Lin J, Vilcek J.** Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Mol Cell Biol.* 10: 3818–3823, 1990.

**Zheng H, Fletcher D, Kozak W, Jiang M, Hofmann KJ, Conn CA, Soszynski D, Grabiec C, Trumbauer ME, Shaw A.** Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice [eng]. *Immunity* 3: 9–19, 1995.

**Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, JR.** Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6 [eng]. *Science* 264: 95–98, 1994.



**Zidar N, Odar K, Glavač D, Jerše M, Zupanc T, Štajer D.** Cyclooxygenase in normal human tissues-is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? [eng]. *J. Cell. Mol. Med.* 13: 3753–3763, 2009.

**Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X.** Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [eng]. *Cell* 90: 405–413, 1997.

**Zou H, Li Y, Liu X, Wang X.** An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 [eng]. *J. Biol. Chem.* 274: 11549–11556, 1999.

## Eigene Publikationen

### Zeitschriftenartikel:

**Bonaterra GA, Then H, Oezel L, Schwarzbach H, Ocker M, Thieme K, Di Fazio P, Kinscherf R.** Morphological Alterations in Gastrocnemius and Soleus Muscles in Male and Female Mice in a Fibromyalgia Model. *PLoS ONE* 11: e0151116, 2016.

**Oezel L, Then H, Jung AL, Jabari S, Bonaterra GA, Wissniowski TT, Önel SF, Ocker M, Thieme K, Kinscherf R, Di Fazio P.** Fibromyalgia syndrome: metabolic and autophagic processes in intermittent cold stress mice. *Pharmacol Res Perspect* 4: e00248, 2016.

### Abstract:

**Bonaterra GA, Then H, Oezel L, Dill L, Rempel W, Ocker M, Di Fazio P, Ocker M, Kinscherf R.** Mitochondrial and inflammatory changes in triceps surae muscle from mice treated with repeated cold stress: a model of fibromyalgia. DOI 10.3337/anatges.2013.0018. *Posterpräsentation auf der 30. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg.* Poster 63, 2013. Available from:

[http://anatomische-gesellschaft.de/data/uploads/content/abstract-archiv/Vortraege\\_Poster\\_30AT\\_HP.pdf](http://anatomische-gesellschaft.de/data/uploads/content/abstract-archiv/Vortraege_Poster_30AT_HP.pdf) [20. Sept. 2016].

## Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrerinnen und Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren in alphabetischer Reihenfolge die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Alter, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Becker, Bette, Bösner, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Dinges, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fuchs-Winkelmann, Görg, Gress, Hegele, Hertl, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Kann, Kanngießer, Kill, Kim-Berger, Kinscherf, Klose, König, Koolman, Kühnert, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Lüers, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Nachtigall, Neubauer, Neumüller, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Peterlein, Plant, Preisig-Müller, Ramaswamy, Renz, Richter, Rosenow, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schofer, Seifart, Seitz, Sekundo, Sommer, Steiniger, Suske, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zemlin

in Wetzikon: Biraima-Steinemann, Frey, Lamdark, Villiger, in Bad Berleburg: Kolbe, Melz, in Fulda: Greim, Kleschin, Lay

## Danksagung

Ich möchte mich hier herzlich bei allen Personen bedanken, die mir während der Zeit der Dissertation mit Rat und Tat zur Seite standen und diese dadurch erst ermöglicht haben.

Zu Beginn möchte ich mich dabei besonders bei Herrn Prof. Dr. Ralf Kinscherf dafür bedanken, dass er mir von Beginn bis zum Ende meiner Dissertation mit sehr großem Engagement, einer sehr guten Betreuung und nützlicher Kritik zur Seite stand und für alle Probleme und Fragen stets ein offenes Ohr hatte.

Auch bei Herrn Dr. Gabriel Bonaterra möchte ich mich ganz herzlich für seine große Hilfsbereitschaft, die guten Ratschläge, seine Zuverlässigkeit und seine scheinbar unendliche Geduld bedanken.

Darüberhinaus möchte ich Frau Andrea Cordes, Frau Anne Henkeler, Frau Claudia Keppler, Frau Irmgard Dammshäuser und Herrn Michael Dreher meinen großen Dank für die gute Einarbeitung und die Hilfe aussprechen.

Außerdem danke ich meiner Freundin Laura Dill, mit der ich die ein oder andere (häufig auch „anderen“) Stunde(n) im Labor verbracht habe und die mich immer wieder zum Weitermachen motiviert hat.

Ein sehr großer Dank geht weiterhin an meine Familie, die während des Studiums und der Dissertation immer für mich da war und ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.